



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SCHIRLEY AP. COSTALONGA

**AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA, MUTAGÊNICA E FITOQUÍMICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE TRÊS ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS.**

VITÓRIA - ES  
2017

SCHIRLEY AP. COSTALONGA

**AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA, MUTAGÊNICA E FITOQUÍMICA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE TRÊS ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.  
Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

VITÓRIA - ES  
2017

**SCHIRLEY AP. COSTALONGA**

**Avaliação alelopática, mutagênica e fitoquímica de extratos vegetais de três espécies exóticas invasoras.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES**  
Orientadora E Presidente da Comissão

---

**Prof. Dr. Hildegardo Seibert França - IFES**  
Examinador Interno

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Tamie Matsumoto - UFES**  
Examinador Interno

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Masrouah Jamal - UFES**  
Examinador Externo

---

**Dr. Luciano Belcavello - DOCTUM**  
Examinador Externo

## AGRADECIMENTOS

À priori, honra e glória a Deus pela força concedida na superação deste desafio, por não me deixar esmorecer e por colocar em minha vida pessoas maravilhosas.

À minha amada mãe, Maria de Lourdes Costalonga, minha apoiadora incondicional, que me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos e que posso conquistar qualquer desejo com perseverança e dedicação. Esse título é da senhora!

A uma pessoa mais do que especial, sem a qual nada disso teria acontecido: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pimentel Batitucci. Nossa relação supera sobremaneira o elo orientador-orientado. Você me guiou em todas as etapas da minha vida acadêmica e sua ética e competência me guiarão eternamente na minha vida profissional. Nossa amizade é eterna!

À minha família e amigos, especialmente aos companheiros Frederico Pereira Pinto e Scheylla Tonon Nunes, por estarem sempre dispostos a ouvir sobre meus avanços, dúvidas e anseios, tendo sempre uma palavra de incentivo. Trabalhar com vocês é uma honra!

Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), em especial aos colegas da Gerência de Recursos Naturais (GRN), por me permitirem a conclusão desta etapa.

À Agência de fomento à pesquisa, por ter fornecido a bolsa de estudos que financiou este trabalho.

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca".

*Dom Hélder Câmara*

## RESUMO

A contaminação biológica é um grave problema ambiental da atualidade, contribuindo para a extinção de espécies nativas. Estudos que visem compreender os mecanismos de invasão empregados pelas espécies invasoras são importantíssimos na busca de soluções eficazes para combatê-las, sendo a alelopatia um promissor campo de investigação; contudo, raramente são estabelecidas as relações entre os efeitos alelopáticos e mudanças ocorridas intracelularmente. Diante disto, o presente estudo objetivou analisar a fitoquímica do extrato etanólico foliar de *Acacia mangium* Willd (acácia), *Artocarpus heterophyllus* Lam (jaqueira) e *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl (ameixeira), bem como inferir sobre suas ações alelopáticas através de quatro organismos-teste (*Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Leucaena leucocephala* e *Urochloa brizantha*) e seu potencial mutagênico utilizando o sistema *A. cepa*. Para o estudo alelopático, sementes dos organismos-teste foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro e submetidas à germinação em água deionizada (controle) ou uma das quatro concentrações de cada um dos extratos avaliados (1, 5, 10 e 50 mg/mL), sendo mensurados os índices de germinação (IG), de velocidade de germinação (IVG), de alelopatia (IA) e de crescimento radicular (IVCR), além do tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e crescimento radicular médio (CRM). No ensaio de mutagenicidade, sementes de *A. cepa* foram submetidas aos tratamentos contínuo e descontínuo (agudo e crônico), em meio contendo água deionizada (CN), o herbicida trifluralina (CP) à 1,9 µL/mL ou uma das concentrações dos extratos; foram analisados os índices mitótico (IM), de efeito aneugênico (IEA), de efeito clastogênico (IEC) e de aberração (IA). Na composição do extrato de *Acacia mangium* foram detectados saponinas, triterpenos e taninos; houve interferência nos IG, IVG e IA de *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; em relação ao TMG, a única espécie influenciada foi *L. leucocephala*, enquanto o VGM foi alterado somente em *L. sativa*. Todos os organismos-teste tiveram os CRM e IVCR afetados. O extrato demonstrou propriedades citotóxicas, uma vez que reduziu o IM de *A. cepa*, mas não interferiu nos IEA, IA e IEC. Em relação ao extrato de *A. heterophyllus* Lam, foi detectada a presença de flavonoides, triterpenos e taninos e houve interferência no IA e IG de *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; já o IVG foi alterado em *L. sativa* e *U. brizantha* enquanto o TMG foi reduzido em *L. leucocephala* e *U. brizantha*. O CRM e IVCR de todos os organismos-teste foram afetados. Além de reduzir o IM, o extrato provocou aumento no IEC, demonstrando que os efeitos alelopáticos observados são reflexos tanto de uma ação citotóxica quanto mutagênica. Por sua vez, o extrato de *Eriobotrya japonica* apresentou flavonoides, esteroides, saponinas e alcaloides e reduziu os IG, IVG e IA em *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; houve queda no VMG de *L. sativa*. O extrato apresentou potencial citotóxico e genotóxico e determinou que o CRM e IVCR de todos os organismos-teste fossem afetados. Das espécies testadas, o extrato de *Eriobotrya japonica* apresentou potencial para o desenvolvimento de um controle biológico para outras invasoras.

**Palavras-chaves:** Alelopatia. Espécies invasoras. Ensaio *A. cepa*. Mutagenicidade.

## ABSTRACT

Biological contamination is one of the most serious environmental problems nowadays and contributes to the extinction of native species. Studies aimed at understanding the mechanisms of invasion used by alien species are very important in the search for effective solutions to combat these species. Allelopathy is a promising field of investigation; however, the relationships between allelopathic effects and intracellular changes are rarely established. This study aimed to analyze the phytochemistry of the foliar ethanolic extract of *Acacia mangium* Willd (forest mangrove), *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit) and *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl (loquat) as well as infer about their allelopathic actions through four test organisms (*Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Leucaena leucocephala* e *Urochloa brizantha*) and its mutagenic potential using the *A. cepa* system. In allelopathic assay, seeds of test organisms germinated on Petri dishes covered with filter paper soaked with deionized water (negative control) or four concentration of each extract (1, 5, 10 and 50 mg/mL); were measured the germination index (GI), germination speed index (GSI), allelopathic index (AI), radicles growth speed index (RGS), germination mean time (GMT), germination mean speed (GMS) and radicles mean length (RML). For mutagenic assay *A. cepa* seeds were submitted to continuous and discontinuous (acute and chronic) treatments in medium with deionized water, the herbicide trifluralin (1,9 µL/mL) - positive control -or one concentration of extracts and were measured the mitotic index (MI), aneugenic effect index (AEI), clastogenic effect index (CEI) and anomaly index (AI). *A. mangium* Willd extract presented in its composition saponins, triterpenes and tanins and affected the GI, GSI and AI of *L. sativa*, *A. cepa* and *U. brizantha*; in relation to GMT, *L. leucocephala* was the only specie affected. The GMS changed only in *L. sativa*. All species had RML and RGS modified. The extract shown cytotoxic properties, since it reduced the MI of *A. cepa* without changed the AEI, AI and CEI. To *A. heterophyllus* Lam extract, was detected flavonoids, triterpenes and tanins and occurred significant changes in AI and GI to *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; the GSI was affected in *L. sativa* e *U. brizantha*, while GMT reduced in *L. leucocephala* e *U. brizantha*. RML and RGS of all test organisms were altered. Besides reducing the MI, the extract caused an increase in CEI demonstrating that the observed allelopathic effects are reflections of both a cytotoxic and a genotoxic action. In turn, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl extract shown flavonoids, steroids, saponins and alkaloids in its phytochemical profile and reduced the GI, GSI and AI in *L. sativa*, *A. cepa* and *U. brizantha*. There was a decline in GMS of *L. sativa*. The extract of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl presented cytotoxic and mutagenic potentials and affected RML and RGS of all test organisms. Of the three species tested, *Eriobotrya japonica* presented potential for the development of a Biological control for other alien species.

**Key words:** Alien species. Allelopathy. *A. cepa* assay. Mutagenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

Figura 1 – Esquema dinâmico do processo de invasão, com suas quatro etapas fundamentais (introdução/colonização, estabelecimento, naturalização e dispersão/invasão).....	34
Figura 2 – Fatores que determinam o sucesso (em vermelho) ou falha (em verde) do processo de invasão biológica.....	37
Figura 3 - Diagrama representando as alterações na estrutura de uma comunidade nativa devida à introdução de espécies invasoras - redução e extinção de espécies, levando à homogeneização da biota. $S_{n_0}$ é o número de espécies nativas presentes na comunidade e $S_{in}$ é o número de espécies invasoras.....	41
Figura 4 – <i>A. mangium</i> Willd.....	63
Figura 5 – Indivíduo de <i>A. mangium</i> no Parque Estadual de Itaúnas – PEI, inibindo alelopaticamente o desenvolvimento de espécie nativa.....	64
Figura 6 – Área de invasão de <i>A. heterophyllus</i> Lam na Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica - ES.....	65
Figura 7 – <i>A. heterophyllus</i> Lam.....	66
Figura 8 – <i>Eriobothrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	67
Figura 9 – <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.....	69
Figura 10 - <i>Urochloa brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster.....	71
Figura 11 - Parque Estadual de Itaúnas, Conceição da Barra – ES, área de coleta de <i>A. mangium</i> Willd.....	74
Figura 12 - Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), Cariacica – ES, área de coleta de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	74



Figura 13 – Parque Estadual de Pedra Azul, Domingos Martins/Vargem Alta – ES, área de coleta de <i>Eriobothrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	75
Figura 14 - Secagem e trituração das folhas das espécies invasoras testadas.....	76
Figura 15 - Preparo do extrato etanólico.....	77
Figura 16 - Detecção de saponina nos extratos testados, onde o colchete destaca a camada de espuma. Da esquerda para a direita, extratos de <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl., <i>A. mangium</i> Willd e <i>A. heterophyllum</i> Lam.....	86
Figura 17 – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	92
Figura 18 – Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	94
Figura 19 – Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	95
Figura 20 - Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	97
Figura 21 – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	99

Figura 22 – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	102
Figura 23 - Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	104
Figura 24 - Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	105
Figura 25 – Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	107
Figura 26 – Alteração no comprimento radicular de <i>Allium cepa</i> .....	108
Figura 27 – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	110
Figura 28 – Radículas de <i>Allium cepa</i> com pontas escurecidas, resultante dos tratamentos com as concentrações de 10 e 50 mg/mL do extrato de <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	111
Figura 29 - Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl. ....	113

Figura 30 - Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....115

Figura 31 - Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....117

Figura 32 - Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....119

Figura 33 - Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....120

Figura 34 - Alterações das radículas de *Leucaena leucocephala* tratadas com 50 mg/mL dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....121

Figura 35 - Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....124

Figura 36 - Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....126

Figura 37 - Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro

concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....127

Figura 38 - Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....129

Figura 39 - Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....130

Figura 40 - Alterações das radículas de *Urochloa brizantha*.....131

## **CAPÍTULO 2**

Figura 1 - Esquematização das etapas de um ciclo de divisão celular normal. Aumento: 400X.....152

Figura 2 - Representação das quatro fases gerais do ciclo celular, onde a intérfase é caracterizada pelas fases G1, S e G2, enquanto a divisão celular de fato ocorre na fase M.....153

Figura 3 - Preparo das lâminas de *A. cepa*.....168

Figura 4 - Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....175

Figura 5 - Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....176

Figura 6 - Radículas de <i>Allium cepa</i> com tamanho reduzido quando submetidas ao tratamento contínuo com 50mg/mL do extrato de <i>A. mangium</i> Willd.....	177
Figura 7 - Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo (CN) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de <i>A. heterophyllum</i> Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....	181
Figura 8 - Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo (CN) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de <i>A. heterophyllum</i> Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....	182
Figura 9 - Radículas de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento descontínuo crônico com 50 mg/mL do extrato etanólico foliar de <i>A. heterophyllum</i> Lam.....	183
Figura 10 - Radículas de <i>Allium cepa</i> com tamanho reduzido quando submetidas ao tratamento contínuo com 10mg/mL do extrato de <i>A. heterophyllum</i> Lam.....	185
Figura 11 - Radículas de <i>Allium cepa</i> tratadas com <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl., apresentando coloração alterada na região meristemática.....	187
Figura 12 - Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl. (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....	189
Figura 13 - Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl. (1, 5, 10 e 50 mg/mL).....	190

Figura 14 - Alterações aneugênicas encontradas nas células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratadas com os extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....193

Figura 15 - Alterações clastogênicas encontradas nas células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratadas com os extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.....194

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Valores de pH para as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	84
Tabela 2 – Análise fitoquímica dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	85
Tabela 3 - Índice de Germinação (IG) para as sementes de <i>L. leucocephala</i> (Lam.) de Wit submetidas a tratamentos para quebra de dormência.....	88
Tabela 4 – Índice de Germinação (IG) para as sementes de <i>U. brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster submetidas a tratamentos para quebra de dormência.....	89
Tabela 5 – Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	91
Tabela 6 – Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de <i>Allium cepa</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	100
Tabela 7 – Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	112
Tabela 8 – Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de <i>Urochloa brizantha</i> submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de <i>A. mangium</i> Willd, <i>A. heterophyllum</i> Lam e <i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.....	123

## CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd..... 171

Tabela 2 – Índice de Aberração (I.A) e classes de anomalias celulares das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd..... 174

Tabela 3 - Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam..... 178

Tabela 4 – Índice de Aberração (I.A) e classes de anomalias celulares das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam..... 180

Tabela 5 – Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *E. japonica* (Thunb.) Lindl..... 186

Tabela 6 – Índice de Aberração (I.A) e classes de anomalias celulares das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo, descontínuo agudo e descontínuo crônico com o controle negativo e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *E. japonica* (Thunb.) Lindl..... 188



# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>21</b>
1.1	HIPÓTESES.....	22
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS FOLIARES DE TRÊS ESPÉCIES INVASORAS.....</b>		<b>24</b>
RESUMO.....		25
ABSTRACT .....		26
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>28</b>
2.1	O HISTÓRICO DA CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA.....	28
2.2	OS MECANISMOS DA INVASÃO BIOLÓGICA .....	32
<b>2.2.1</b>	<b>A teoria da contaminação biológica .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Características apresentadas pelas espécies invasoras e a susceptibilidade de um ambiente invadido.....</b>	<b>37</b>
2.3	O PAPEL DAS INTERAÇÕES BIOLÓGICAS NO PROCESSO DE INVASÃO E SEUS EFEITOS NOS PROCESSOS ECOSSISTÊMICOS.....	39
<b>2.3.1</b>	<b>Alelopatia: Seu desenvolvimento e importância no processo de invasão .....</b>	<b>42</b>
2.3.1.1	Metabólitos Secundários .....	45
2.3.1.2	A germinação como avaliação da alelopatia .....	48

2.4	A CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA NA AMÉRICA LATINA: ASPECTOS AMBIENTAIS E LEGISLATIVOS .....	50
2.4.1	<b>Situação brasileira</b> .....	54
2.4.2	<b>Panorama no Espírito Santo</b> .....	59
2.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGUMAS DAS ESPÉCIES INVASORAS COM ELEVADO GRAU DE INVASÃO NO ESPÍRITO SANTO .....	61
2.5.1	<b><i>Acacia mangium</i> Willd</b> .....	61
2.5.1.1	Características botânicas .....	63
2.5.1.2	Aspectos ecológicos.....	63
2.5.2	<b><i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam</b> .....	64
2.5.2.1	Características botânicas .....	65
2.5.2.2	Aspectos ecológicos.....	66
2.5.3	<b><i>Eriobothry japonica</i> (Thunb.) Lindl.</b> .....	67
2.5.3.1	Características botânicas .....	67
2.5.3.2	Aspectos ecológicos.....	68
2.5.4	<b><i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit</b> .....	68
2.5.4.1	Características botânicas .....	68
2.5.4.2	Aspectos ecológicos.....	69
2.5.5	<b><i>Urochloa brizantha</i> (Hochst. Ex A. Rich.) R.D. Webster</b> .....	70
2.5.5.1	Características botânicas .....	70
2.5.5.2	Aspectos ecológicos.....	71
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	72
3.1	OBJETIVO GERAL.....	72
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	72

<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
4.1	ÁREA DE COLETA DAS ESPÉCIES VEGETAIS .....	73
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS .....	76
4.3	DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA E DO Ph DOS EXTRATOS .....	78
4.4	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	78
<b>4.4.1</b>	<b>Flavonóides .....</b>	<b>78</b>
4.4.1.1	Reação de Cianidina .....	78
4.4.1.2	Reação com Cloreto de Alumínio (AlCl <sub>3</sub> ) .....	79
<b>4.4.2</b>	<b>Triterpenos e Esteroides .....</b>	<b>79</b>
4.4.2.1	Reação de Liebermann-Burchard .....	79
4.4.2.2	Reação de Salkowski .....	79
<b>4.4.3</b>	<b>Cumarina.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Saponina espumídica.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Alcalóides .....</b>	<b>80</b>
<b>4.4.6</b>	<b>Taninos.....</b>	<b>80</b>
<b>4.4.7</b>	<b>Glicosídeos Antraquinônicos.....</b>	<b>80</b>
4.5	TESTE DE QUEBRA DE DORMÊNCIA .....	80
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS.....	81
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	83
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA MASSA SECA E DO pH DOS EXTRATOS.....	84
5.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	85
5.3	TESTE PARA QUEBRA DE DORMÊNCIA .....	87
5.4	AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS FOLIARES .....	89
<b>5.4.1</b>	<b>Ensaio com <i>Lactuca sativa</i>.....</b>	<b>90</b>

5.4.2	Ensaio com <i>Allium cepa</i> .....	100
5.4.3	Ensaio com <i>Leucaena leucocephala</i> .....	111
5.4.4	Ensaio com <i>Urochloa brizantha</i> .....	122
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	133
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	134
	<b>CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DOS EXTRATOS FOLIARES DE TRÊS ESPÉCIES INVASORAS POR MEIO DO BIOENSAIO <i>Allium cepa</i>.</b> .....	145
	RESUMO .....	146
	ABSTRACT .....	147
1	INTRODUÇÃO .....	148
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	149
2.1	O HISTÓRICO DA GENÉTICA TOXICOLÓGICA .....	149
2.2	O PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR E SEUS MECANISMOS DE CONTROLE .....	151
2.2.1	Intérfase .....	153
2.2.2	Mitose .....	154
2.2.2.1	PRÓFASE .....	155
2.2.2.2	METÁFASE .....	156
2.2.2.3	ANÁFASE .....	156
2.2.2.4	TELÓFASE .....	156
2.2.3	Citocinese .....	156
2.2.4	Controle do ciclo celular .....	157
2.3	MUTAÇÕES: CONSEQUÊNCIA DE FALHAS NOS MECANISMOS DE REPARO .....	161

2.4	O BIOENSAIO <i>Allium cepa</i> COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA.....	162
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	165
3.1	OBJETIVO GERAL.....	165
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	165
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	166
4.1	ÁREA DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL.....	166
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA SOBRE O SISTEMA-TESTE <i>Allium cepa</i> .....	166
4.2.1	Preparação citológica e análise das lâminas.....	167
4.2.2	Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.....	168
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	169
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	170
5.1	AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE <i>Acacia mangium</i> Willd.....	170
5.2	AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	177
5.3	AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl. ....	185
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	195
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	196

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos maiores biomas do planeta e importante hotspot de biodiversidade, a Mata Atlântica vem sofrendo com a degradação de seus ecossistemas. Segunda maior causa mundial de perda de biodiversidade (sendo a primeira em ilhas e áreas naturais protegidas), as espécies exóticas invasoras contribuem enormemente para essa degradação, uma vez que, segundo Westbrooks (apud SANTANA e ENCINAS, 2008), ao contrário de outros problemas ambientais, a contaminação biológica tende a se multiplicar constante e rapidamente, impedindo a recuperação dos ecossistemas afetados.

Para dominarem novos habitats, as espécies invasoras utilizam diversos mecanismos que lhes proporcionam vantagens adaptativas sobre as nativas, como crescimento acelerado, taxa de germinação elevada e ausência de inimigos naturais; uma importante estratégia ainda pouco estudada pela comunidade científica é a produção de compostos alelopáticos que interferem no desenvolvimento de outras plantas e as auxiliam no estabelecimento em novos ambientes. Além disso, a maioria das pesquisas envolvendo alelopatia se restringe aos efeitos sobre a germinação e o crescimento dos organismos-teste, desconsiderando os aspectos celulares e moleculares relacionados a esses parâmetros fisiológicos; todavia, é fundamental considerar que os efeitos visíveis dos fitoquímicos sobre o organismo vegetal espelham apenas uma sinalização secundária de mudanças anteriores (FERREIRA e AQUILA, 2000) que podem ter ocorrido em nível celular e molecular. Portanto, a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade dos aleloquímicos é um valioso recurso para o entendimento dessas interferências.

Apesar de ser um dos únicos estados brasileiros a possuir um Plano para o Controle de Exóticas Invasoras, todas as Unidades de Conservação do Espírito Santo estão impactadas pela contaminação biológica, o que dificulta drasticamente a execução de quaisquer ações de manejo, conservação e restauração desses ambientes. Infelizmente, pouco se tem avançado nessa área devido à escassez de pesquisas que busquem compreender os mecanismos empregados pelas principais espécies-problema na ocupação de novos habitats e na dominância sobre as comunidades nativas.

As propriedades alelopáticas e mutagênicas de espécies invasoras quase nunca são investigadas e, menos ainda, são estabelecidas as relações entre tais ações. É de suma importância, portanto, unir ambos os aspectos a fim de que se possa obter uma ampla compreensão dos mecanismos utilizados por essas espécies para dominarem os ambientes, além de oferecer oportunidade para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem seu efetivo controle, sem afetar ainda mais os ecossistemas por elas impactados.

## 1.1 HIPÓTESES

- **H1** – As espécies exóticas invasoras possuem estratégias que as favorecem na ocupação de novos ambientes, trazendo vantagens adaptativas que as permitam dominarem sobre as espécies nativas. Um desses mecanismos é a produção de substâncias que interferem no desenvolvimento de outros vegetais graças a uma ação alelopática.
- **H2** – As alterações ocorridas no processo de germinação e desenvolvimento de um vegetal podem ser reflexo de mudanças ocorridas em nível celular e, até mesmo, genético (ação mutagênica).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a análise fitoquímica preliminar e avaliar as ações alelopática e mutagênica dos extratos etanólicos foliares de três espécies invasoras presentes em Unidades de Conservação Estaduais (*Artocarpus heterophyllus* Lam, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl e *Acacia mangium* Willd).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd;
- Inferir sobre possíveis efeitos alelopáticos exercidos por extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Allium cepa* e *Lactuca sativa*;
- Analisar se os extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd possuem efeito alelopático sobre a germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies invasoras - *Urochloa brizantha* e *Leucaena leucocephala* – podendo servir como base para o desenvolvimento de uma forma de controle biológico para estas;
- Investigar o potencial tóxico, aneugênico e clastogênico dos extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd sobre o desenvolvimento inicial de células meristemáticas radiculares de *A. cepa*;
- Correlacionar os efeitos alelopáticos observados com mudanças ocorridas intracelularmente e alterações no material genético.



## **CAPÍTULO 1**

### **Avaliação fitoquímica e alelopática dos extratos foliares de três espécies invasoras.**

Autor: Schirley Costalonga<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

\* Autor para correspondência: [schirleycostalonga@uol.com.br](mailto:schirleycostalonga@uol.com.br)

## RESUMO

Espécies exóticas invasoras contribuem para a extinção de espécies nativas e compreender os mecanismos que favorecem seu domínio é importantíssimo na busca de soluções eficazes para o combate a essas espécies; neste ponto, investigações sobre suas propriedades alelopáticas são fundamentais. Assim, objetivou-se estudar a composição química do extrato etanólico foliar de *Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam e *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl., bem como inferir sobre suas ações alelopáticas por meio de quatro organismos-teste (*Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Leucaena leucocephala* e *Urochloa brizantha*). Sementes dos organismos-teste foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro e submetidas à germinação em água deionizada (controle) ou uma das quatro concentrações de cada extrato avaliado (1, 5, 10 e 50 mg/mL). Para o estudo alelopático, foram mensurados os índices de germinação (IG), de velocidade de germinação (IVG), de alelopatia (IA) e de crescimento radicular (IVCR), além do tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG) e crescimento radicular médio (CRM). O extrato de *Acacia mangium* apresentou saponinas, triterpenos e taninos em sua composição, tendo afetado os IG, IVG e IA de *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; em relação ao TMG, a única espécie afetada foi *L. leucocephala*, enquanto o VMG foi alterado somente em *L. sativa*. Todos os organismos-teste tiveram os CRM e IVCR afetados. Flavonoides, triterpenos e taninos foram detectados no extrato de *A. heterophyllus* Lam; houve alteração no IA e IG de *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; já o IVG foi modificado significativamente em *L. sativa* e *U. brizantha*, enquanto o TMG foi reduzido em *L. leucocephala* e *U. brizantha*. O CRM e IVCR de todos os organismos-teste foram afetados. Em relação ao extrato de *Eriobotrya japonica*, foi detectada a presença de flavonoides, esteroides, saponinas e alcaloides e reduziu os IG, IVG e IA em *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha* e o VMG de *L. sativa*. Os extratos testados exerceram alelopatia sobre os organismos-teste, comprovando ser este um dos mecanismos utilizados por estas invasoras na conquista de novos ambientes; ademais, a maior concentração aplicada demonstrou potencial para afetar o desenvolvimento inicial das invasoras *L. leucocephala* e *U. brizantha*.

**Palavras-chaves:** *A. mangium* Willd. Alelopatia. *A. heterophyllus* Lam. Contaminação biológica. *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Espécies invasoras.

## ABSTRACT

Alien species contributes to the extinction of native species. Understanding the mechanisms that promote their domain over native species is very important in the search for effective solutions to combat these species; at this point, researches about allelopathic properties of that species are essential. In this way, this study aimed to analyze the chemistry constitution of the foliar ethanolic extract of *Artocarpus heterophyllus* Lam, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl e *Acacia mangium* Willd), as well as infer about their allelopathic actions through four test organisms (*Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Leucaena leucocephala* e *Urochloa brizantha*). Seeds of test organisms germinated on Petri dishes covered with filter paper soaked with deionized water (negative control) or four concentration of each extract (1, 5, 10 and 50 mg/mL). In allelopathic assay were measured the germination index (GI), germination speed index (GSI), allelopathic index (AI), radicles growth speed index (RGSi), germination mean time (GMT), germination mean speed (GMS) and radicles mean length (RML). *A. mangium* Willd extract presented in its composition saponins, triterpenes and tanins and affected the GI, GSI and AI of *L. sativa*, *A. cepa* and *U. brizantha*; in relation to GMT, *L. leucocephala* was the only specie affected. The GMS changed only in *L. sativa*. All species had RML and RGSi modified. To *A. heterophyllus* Lam extract, was detected flavonoids, triterpenes and tanins and occurred significant changes in AI and GI to *L. sativa*, *A. cepa* e *U. brizantha*; the GSI was affected in *L. sativa* e *U. brizantha*, while GMT reduced in *L. leucocephala* e *U. brizantha*. RML and RGSi of all test organisms were altered. In turn, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl extract shown flavonoids, steroids, saponins and alkaloids in its phytochemical profile and reduced the GI, GSI and AI in *L. sativa*, *A. cepa* and *U. brizantha*. There was a decline in GMS of *L. sativa*. The extracts demonstrated allelopathic properties what indicates that it is one of the mechanisms used by alien species to conquer new environments. The major concentration shown potential to affected the earlier development of another alien species, like *L. leucocephala* e *U. brizantha*.

**Key words:** *A. mangium* Willd. Alien species. Allelopathy. *A. heterophyllus* Lam. Biological contamination. *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

## 1 INTRODUÇÃO

A história da vida no planeta é profundamente marcada pela destruição de espécies nativas<sup>1</sup> por espécies introduzidas; todavia, no último século, observa-se que esse fenômeno está ocorrendo com maiores velocidade e frequência devido, em grande parte, à contribuição humana – mesmo que involuntária.

Desde os primórdios, o ser humano possui uma relação íntima de dependência com as plantas; estas influenciaram intensamente os rumos da humanidade e definiram o modo de vida de muitas civilizações. Em sua busca incessante por novos territórios, o homem colaborou ativamente para a dispersão de espécies vegetais ao atuar como facilitador na quebra das barreiras ecológicas que limitavam seu habitat ao transportá-las para locais afastados de seus sítios de origem, o que permitiu sua adaptação a condições ambientais até então desconhecidas, culminando com o expressivo aumento na ocorrência de espécies exóticas<sup>2</sup> por todo o globo terrestre presenciado na atualidade.

Tal fato não seria alarmante não fosse o alto potencial para modificar sistemas naturais apresentado por algumas espécies exóticas, causando declínio ou – até mesmo - a extinção dos seres nativos ao local invadido; atualmente, a contaminação biológica por espécies exóticas invasoras<sup>3</sup> é a segunda maior ameaça mundial à biodiversidade (primeira em ilhas e áreas naturais protegidas<sup>4</sup>), perdendo apenas para a destruição de habitats pela exploração humana direta. As severas mudanças causadas no funcionamento do ecossistema impactado impedem sua recuperação natural e dificultam ações conservacionistas; destarte, estudos que visem conhecer mais profundamente os mecanismos de invasão utilizados por essas espécies são fundamentais na busca por soluções para esse grave problema ambiental.

---

<sup>1</sup> Espécies que ocorrem dentro de sua área natural de distribuição, onde coevoluíram para formar uma comunidade (KOIKE et al., 2006).

<sup>2</sup> Também chamadas de introduzidas ou alóctones, são espécies que ocorrem fora de sua área natural de distribuição (CDB, Decisão V/8 apud BRASIL, 2000; IUCN, 2006; BRASIL, 2011a).

<sup>3</sup> Organismos exóticos que, uma vez introduzidos a um novo ambiente, se adaptam, passam a se reproduzir de maneira consistente e a dominar sobre espécies nativas, causando impactos ambientais, econômicos e sociais negativos (BRASIL, 2011a; VITULE; PRODOCIMO, 2012; MORO et al., 2012).

<sup>4</sup> Nesses ambientes, o isolamento da biota leva à menor exposição evolutiva às condições adversas, como introdução de novos patógenos, etc. (RODRIGUES, 2013, p. 166).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O HISTÓRICO DA CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA

A história da invasão biológica pode ser atribuída tanto a eventos geológico-evolutivos, quanto à intervenção humana. Os registros fósseis dos últimos 25 milhões de anos, junto com outras evidências, indicam que os organismos terrestres estiveram em constante movimentação devido a eventos geológicos que aproximaram e afastaram as placas continentais, criando e destruindo porções de terra pela variação do nível do mar, culminando com o intercâmbio de conjuntos inteiros de espécies (LOWE et al., 2004; SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005). Por possuírem biotas com características distintas devido ao fenômeno de especiação, cada continente possui a capacidade de prover invasores para outros locais (REICHARD; WHITE, 2003). Assim, “[...] a distribuição de espécies em um dado período da história resulta de um equilíbrio entre migrações e extinções” (MATTHEWS, 2005).

O homem transporta espécies para além de suas barreiras naturais desde o início da agricultura, mas foi com o início das grandes navegações por volta do século XV que o fenômeno ganhou destaque (SAMPAIO; SCHMIDT, 2013).

Charles Darwin, em seu livro *A Origem das Espécies*, relatou o fenômeno das invasões ao afirmar que

[...] em alguns casos, o processo de extinção pode ter sido rápido, como em casos em que tenha ocorrido a imersão total de uma ilha, ou havido a fragmentação de um istmo, e a consequente invasão de uma grande quantidade de novos habitantes para um mar vizinho. (DARWIN, 2004, p. 421).

A esta importante obra na história da biologia também é creditada a mais antiga referência científica à invasão biológica (1859) como causa de extinção de espécies,

[...] deve ter acontecido, muitas vezes, [de] uma espécie nova aproveitar e ocupar o lugar de outra espécie pertencente a um grupo diferente, e assim provocar a sua extinção. Se esta forma invasora produzir muitas outras formas afins, outras espécies terão de se render e de lhes ceder o lugar [...]. Adicionalmente, quando, através de imigrações súbitas ou de um desenvolvimento invulgarmente rápido, muitas espécies de um novo grupo se apoderaram de uma região qualquer, muitas espécies antigas terão sido exterminadas com uma rapidez correspondente; [...]. (Darwin, 2004, p. 424).

Em 1890, Wallace fez referência à invasão causada pelo rato marrom, originário do sudeste asiático e que, pela ação humana, se alastrou pelo mundo. (VITULE; PRODOCIMO, 2012).

Após os escritos de Darwin e Wallace, o assunto da contaminação biológica volta a receber atenção da comunidade científica somente na segunda metade do século XX, mais precisamente em 1958, com a publicação do livro *Ecology of invasions by animals and plants*, de Charles Elton (REICHARD; WHITE, 2003; MORO et al., 2012); considerado o marco inicial para a ecologia das invasões (PETENON; PIVELLO, 2008), a obra expôs a teoria de que comunidades ricas em diversidade de espécies são mais resistentes à invasão do que aquelas com baixa biodiversidade, além de creditar à globalização uma contribuição ativa na dispersão de organismos a novos habitats (BARNES, 2014). Segundo Elton, o mundo vivia uma “explosão ecológica” causada por espécies não nativas que tinham o potencial de causar danos aos ecossistemas, além de poderem impactar a saúde humana e a economia (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005) e que, portanto, havia a necessidade da ampliação do conhecimento relativo a essas espécies, visando o estabelecimento de estratégias de controle eficazes (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005; MATOS; PIVELLO, 2009).

As guerras mundiais contribuíram sobremaneira para a dispersão de espécies de um lugar ao outro, com muitas delas sendo utilizadas para recuperar locais devastados pelas batalhas; outras foram levadas acidentalmente por aeronaves militares e junto aos pertences dos soldados (McNEELY, 2001).

Com o objetivo de discutir temas relevantes internacionalmente no campo da biologia, ocorreu em 1964, na Califórnia, o I Simpósio de Ciências Biológicas, com enfoque para as mudanças evolutivas que poderiam ocorrer devido à introdução de espécies em novos ambientes; o resultado culminou na publicação, um ano depois, de *A genética das espécies colonizadoras*<sup>5</sup>, por Baker e Stebbins. Neste mesmo ano, Jonh Harper declarou que “o movimento do homem e seus deuses resultou em um bombardeio terrestre e marítimo por espécies alienígenas, ambos por troca e

---

<sup>5</sup> Com a contribuição de 27 autores pertencentes a 11 países, a obra não utilizava o termo “invasora”; ao invés disso eram empregadas palavras como “população encontrada”, “colonizadores”, “introduzidas” e “não-nativas”. (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005).

deliberada introdução de plantas cultivadas de jardins e fazendas” (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005).

Em 1966, o livro intitulado *The Alien Animals: The Story of Imported Wildlife* foi, segundo Davis (apud CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005), uma exceção às publicações da época, uma vez que – baseado em mais de 200 publicações científicas sobre animais e plantas introduzidos – fornecia um enfoque conservacionista do tema. Todavia, mesmo com algumas contribuições relevantes, a década dos 1960 não foi conhecida pela atenção dispensada à problemática da invasão.

Somente com a evolução da biologia da conservação como disciplina na década de 1970 é que o aspecto conservacionista das espécies introduzidas passa a ser explorado; surge a revista científica *Biological Conservation*, elevando o número de artigos que sinalizavam para os perigos às espécies nativas. Segundo Davis (apud CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005), essa foi a primeira década pós Elton que a invasão biológica apareceu com frequência na literatura científica.

Em 1980, ocorreu um aumento no número de estudos com abordagem na invasão biológica, especialmente relacionado às plantas e suas interações ecológicas; as espécies invasoras se tornaram instrumentos para teste de diversas teorias, incluindo a de Biogeografia de Ilhas. Em 1981, é publicado o primeiro exemplar do conceituado *Ecological Restoration Journal*, especializado em publicações sobre manejo e desenvolvimento de comunidades nativas; no mesmo ano ocorreu a 3ª Conferência Internacional de Ecossistemas Mediterrâneos, culminando, em 1983, com a formação de um comitê científico para estudos acerca dos impactos nos ecossistemas agrícolas advindos da invasão biológica (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005).

Em 1987 é fundada a Society for Ecological Restoration – SER, cuja missão de “promover a restauração ecológica a fim de sustentar a vida na Terra e restabelecer uma relação ecologicamente saudável entre natureza e cultura” é realizada atentando-se para o controle/erradicação de espécies invasoras e o plantio de nativas (SER, acesso em 09 dez. 2015, tradução nossa).

Os anos 90 marcaram a consagração definitiva do tema da contaminação biológica como um campo de pesquisa, com duas frentes principais de investigação:

[...] a primeira é focada nas espécies ou populações de invasoras, onde se incluem diagnósticos [destas espécies] e da extensão do fenômeno, a caracterização dos processos e padrões da invasão, as estratégias competitivas das espécies invasoras; a segunda enfatiza a comunidade e o ecossistema, investigando os fatores do ambiente que lhe possam conferir resistência ou suscetibilidade à invasão, bem como os impactos causados. (PETENON; PIVELLO, 2008).

Segundo Reichard e White (2003), isso só foi possível graças ao desenvolvimento da base científica que explicasse a biologia da invasão e à urgência em se obter soluções para o problema, considerando o recente aumento na frequência das invasões dos últimos vinte anos. Corroborando o crescente interesse pelas espécies invasoras, em 1997 foi criado, o GISP - Global Invasive Species Program<sup>6</sup> e publicado o livro *Biological Invasions: Theory and Practice*, que explicava a dispersão de espécies por meio de modelos matemáticos (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005).

Em 2000, a influência das relações mutualísticas entre plantas-microrganismos do solo no processo de invasão e a genética das espécies introduzidas passaram a ser investigadas, reconhecendo-se a importância de novos genótipos para a dispersão de espécies (CADOTTE; McMAHON; FUKAMI, 2005). Nesse período, surge a “hipótese da liberação do inimigo” (the enemy release hypothesis<sup>7</sup>), uma das muitas teorias que buscam explicar o rápido estabelecimento e proliferação do organismo invasor; para esta hipótese, o fato pode ser atribuído à ausência de seus inimigos naturais (patógenos, predadores e parasitas), inexistentes na comunidade invadida (COLAUTTI et al., 2004).

Ainda no ano 2000, a IUCN (The World Conservation Union) publicou o *Guia para prevenção da perda de biodiversidade causada por espécies invasoras* e em 2006, criou um banco de dados global para espécies invasoras, objetivando “aumentar o interesse do público acerca das espécies introduzidas que geram impactos

---

<sup>6</sup> Constitui atualmente um dos principais veículos para obtenção de informações sobre espécies exóticas invasoras e técnicas para seu manejo e controle (PETENON; PIVELLO, 2008).

<sup>7</sup> Cabe ressaltar que a ausência de inimigos naturais no ambiente invadido é apenas um dos fatores que podem contribuir para o sucesso da invasão. Também são relevantes as variáveis climáticas, genótipo das espécies exóticas, disponibilidade de recursos e distúrbios causados pelo homem.



negativos à biodiversidade e facilitar a prevenção efetiva e as atividades de manejo [...]” (IUCN, acesso em 10 dez.2015, tradução nossa).

Assim, desde a publicação de Darwin em 1859, o estudo da biologia/ecologia da contaminação biológica evoluiu de simples conjecturas ao nível de objetividade científica, tornando-se, segundo Francis (2011) um campo emergente onde,

[...] existem publicações dedicadas ao tema (ex. Biological Invasion) e há um número substancial de artigos científicos publicados [...], há um claro e significativo interesse da comunidade internacional em relação à invasão e uma quantidade considerável de cientistas estão envolvidos na pesquisa e manejo das espécies invasoras [...]. (tradução nossa).

A despeito dessa evolução, diversas questões seguem pendentes de esclarecimentos; a perda de biodiversidade, o desmatamento em larga escala e a crescente urbanização, responsáveis pela fragmentação de habitats, criam novas oportunidades de invasão. As modificações causadas pela ação humana, dentre elas a contaminação biológica, não só definiram a nova era em que vivemos – Antropoceno – como iniciaram o sexto evento de extinção em massa, cujas implicações afetarão a existência do próprio homem (SIMÕES et al., 2017). Destarte, é imperioso que novos estudos testem hipóteses e teorias visando à ampliação do conhecimento e à implementação de técnicas de manejo eficazes no combate à degradação de habitats nativos (REICHARD; WHITE, 2003) de forma a minimizar a atual perda de biodiversidade.

## 2.2 OS MECANISMOS DA INVASÃO BIOLÓGICA

Apesar de ser um fenômeno frequente nos dias atuais, a invasão de espécies é uma ocorrência tão antiga quanto à existência de vida no planeta. Poucas espécies residem somente em seu local de evolução; elas aumentam, reduzem e mudam sua distribuição geográfica devido a questões ecológicas, evolutivas, geográficas e climáticas, levando ao aparecimento de biotas locais e regionais (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005).

As atividades humanas têm reduzido efetivamente o grau de isolamento de ilhas e continentes, aumentando a capacidade de dispersão de milhares de plantas, animais e microrganismos. Conforme Dias e outros (2013), parte das espécies exóticas que são introduzidas (acidental ou intencionalmente) em outro habitat, se

tornam por demasiado eficientes no uso dos novos recursos (água, nutrientes, etc.), a ponto de modificarem as características e funcionalidade do ecossistema invadido, homogeneizando a biota e gerando perda de biodiversidade devido à redução das populações nativas.

Atualmente, a invasão de espécies representa a maior crise para a conservação de comunidades nativas, juntamente com a mudança climática<sup>8</sup> e fragmentação de habitats; de acordo com Ziller (2001),

O agravante dos processos de invasão, comparados à maioria dos problemas ambientais, é que ao invés de serem absorvidos com o tempo e terem seus impactos amenizados, agravam-se à medida que as plantas exóticas invasoras ocupam o espaço das nativas. As consequências principais são a perda da biodiversidade e a modificação dos ciclos e características naturais dos ecossistemas atingidos, a alteração fisionômica da paisagem natural, com consequências econômicas vultosas.

Diversas pesquisas buscam entender como uma espécie exótica obtém sucesso em dominar novos ambientes, bem como quais são as características que tornam esses locais susceptíveis à invasão. Todavia, há uma grande disparidade nas metodologias utilizadas para o estudo da contaminação biológica, uma vez que não há indicadores globais desenvolvidos para minimizar distorções na interpretação dos resultados e que sejam capazes de adaptarem-se às constantes mudanças no saber científico (McGEOCH; CHOWN; KALWIJ, 2006). Conforme Sax, Stachowicz e Gaines (2005, p.15), “o estudo da invasão por espécies exóticas pode prover mecanismos para compreender o papel dos diferentes tipos de interações específicas na composição e estruturação das comunidades [...]” (tradução nossa).

### **2.2.1 A teoria da contaminação biológica**

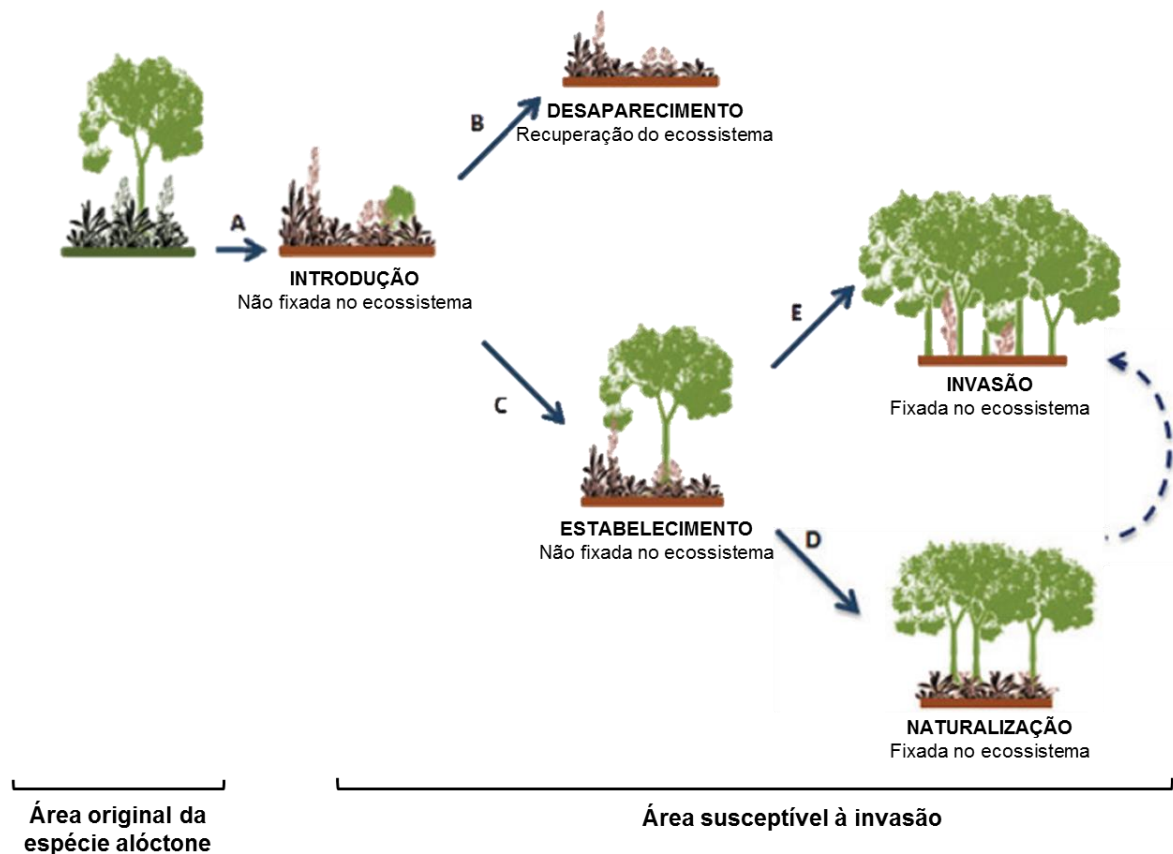
A invasão biológica é o resultado de uma cadeia de eventos, cujo início envolve o transporte do organismo de sua área de ocorrência (região doadora) para um local receptor e resulta na consolidação de uma população autossustentável no ecossistema receptor, gerando impactos ecológicos e econômicos negativos (BARNES, 2014). Entre essas etapas, a espécie exótica deverá, de acordo com Blackburn e colaboradores (apud VITULE; PRODOCIMO, 2012), transpor quatro

---

<sup>8</sup> Eventos extremos, como ventos fortes, provocados pela mudança climática podem atuar como rota de transporte para os organismos (BURGIEL; MUIR, 2010).

estágios para se tornar invasora: colonização, estabelecimento, naturalização e dispersão (figura 1).

**Figura 1** – Esquema dinâmico do processo de invasão, com suas quatro etapas fundamentais (introdução/colonização, estabelecimento, naturalização e dispersão/invasão).



Fonte: LORENZO; GONZÁLES (2010) – adaptado pelo autor.

A colonização ou introdução é apenas o primeiro passo para uma espécie se tornar invasora e é altamente dependente de duas circunstâncias distintas: a redução/eliminação física da barreira geográfica que previamente limitava sua distribuição e a capacidade dos indivíduos em cruzar essa barreira<sup>9</sup>. (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005). Quando esta etapa é superada, diz-se que a espécie está introduzida.

<sup>9</sup> De acordo com Sax, Stachowicz e Gaines (2005), a habilidade de transpor barreiras pode ser passiva (quando a espécie assume forma de vida latente, como cisto, esporo, etc., para resistir aos fatores ambientais adversos) ou ativa (quando se otimiza o uso das reservas alimentares durante o cruzamento da barreira).

O entendimento das etapas da introdução é determinante na prevenção de novas contaminações, uma vez que, segundo McGeoch, Chown e Kalwij (2006), há apenas duas abordagens para eliminação de espécies invasoras: atuar logo nas etapas iniciais, quando a espécie ainda não se estabeleceu, limitando seu potencial de introdução e distribuição pelo novo ambiente, ou realizar o controle e manejo daquelas que já se estabeleceram.

O sucesso na etapa de estabelecimento de uma espécie invasora depende, conforme Sax, Stachowicz e Gaines (2005), de fatores como:

- Ausência de inimigos naturais e parasitas na biota receptora;
- Apresentar características diferentes<sup>10</sup> da biota receptora que as permitam ter uma alta performance competitiva ao explorarem os recursos disponíveis (água, luz, nutrientes, etc.); e
- Características físicas e químicas similares entre os habitats do invasor e o receptor ou ocorrência de modificações no ambiente receptor que facilite o estabelecimento dos invasores<sup>11</sup>.

Pode-se dizer, portanto, que a biota doadora (invasora) tende a ter espécies altamente competitivas e com altos desempenhos defensivo e reprodutivo em comparação com a biota receptora (invadida).

Superada a barreira geográfica, inicia-se a superação da barreira ambiental, com o organismo exótico se reproduzindo e conseguindo gerar descendentes férteis e aptos a sobreviver no novo habitat. Esse processo pode levar anos e quando superado, a espécie é considerada estabelecida<sup>12</sup> (THE NATURE CONSERVANCY, 2009; LEÃO et al., 2011). Após, começa o processo de naturalização, por meio da formação de populações autorregenerativas<sup>13</sup> (RICHARDSON et al., 2000);

---

<sup>10</sup> *Teoria da competição por recursos*: prevê que as espécies podem coexistir se seus habitats são espacial ou temporariamente heterogêneos ou se estas possuírem curvas de exploração de recursos distintas; assim, invasores potenciais terão maiores taxas de crescimento, atingindo a maturidade mais rapidamente, e maiores chances de estabelecimento se explorarem recursos menos consumidos pelas nativas (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005).

<sup>11</sup> Por essa razão ambientes degradados se tornam altamente susceptíveis à contaminação biológica.

<sup>12</sup> A superação desse estágio depende de fenômenos ecológicos e/ou condições biofísicas, bem como de características da espécie exótica que facilitem sua dispersão e dominância (HOROWITZ; MARTINS; WALTER, 2013).

<sup>13</sup> Neste momento, a população introduzida já apresenta tamanho considerável para deixar de ser susceptível à extinção (RICHARDSON et al., 2000).

entretanto, para completar o processo de invasão, é necessário que os fatores limitantes à dispersão sejam superados a fim de que a espécie possa expandir sua distribuição para além da área introduzida (THE NATURE CONSERVANCE, 2009; LEÃO et al., 2011) e – para isso - a “pressão de propágulos” desempenha papel crucial (PYSEK; JAROSIK; PERGL, 2011).

Para Vitule e Prodocimo (2012),

[...] espécies com maior potencial de reintroduções [...] e/ou com um grande número de indivíduos introduzidos com frequências altas são mais susceptíveis a se tornarem invasoras; de forma similar, locais com maior número de espécies ou taxa introduzidos podem se tornar mais facilmente invadidos por novos taxa.

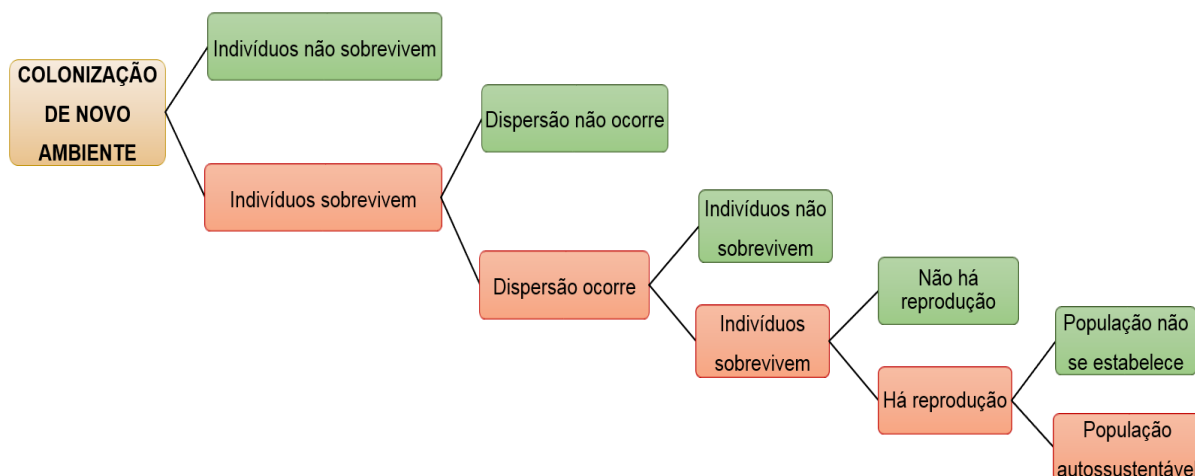
A “pressão de propágulos” é, portanto, uma medida do esforço de introdução, tanto em número de propágulos liberados, como em número de eventos de liberação e distância da planta mãe (JOHNSTON; PIOLA; CLARK, 2009); a partir daí a espécie exótica invasora entra em processo crescente de dominância e expansão populacional, cujos limites estão nas fronteiras do ambiente invadido ou na interferência humana (RICHARDSON et al., 2000).

A resiliência do propágulo invasor é essencial para seu sucesso no processo de invasão, atuando para aumentar a sobrevivência do organismo não somente durante o período de transporte, mas também no ambiente receptor (JOHNSTON; PIOLA; CLARK, 2009).

Assim, uma espécie exótica só se tornará invasora se, de forma resumida, superar três filtros evolutivos: filtro histórico ou geográfico, que isola as espécies em seu local de origem; filtro fisiológico ou ambiental; e filtro biótico, ou seja, as interações entre as espécies autóctones e alóctones (LORENZO; GONZÁLES, 2010). Um exemplo dessas interações é a alelopatia exercida pelas invasoras, afetando o desenvolvimento das nativas.

A figura 02 evidencia a complexidade envolvida no processo de contaminação biológica (baseado em VITULE; PRODOCIMO, 2012), uma vez que são vários os fatores determinantes para seu sucesso; isso explica por que apenas uma pequena parte das espécies introduzidas se torna invasora e por qual motivo é tão difícil controlá-las a partir deste ponto.

**Figura 2** – Fatores que determinam o sucesso (em vermelho) ou falha (em verde) do processo de invasão biológica.



Fonte:..Elaborado pelo autor.

## 2.2.2 Características apresentadas pelas espécies invasoras e a susceptibilidade de um ambiente invadido

Conforme Johnston, Piola e Clark (2009), formas de transporte<sup>14</sup>, características desenvolvidas ao longo da história evolutiva da espécie e atributos do ambiente receptor contribuem para determinar quais espécies se tornam invasoras. A capacidade de tolerar e/ou se adaptar aos estresses biótico e abiótico são determinantes para o potencial de um organismo em colonizar um novo habitat.

As características que conferem um alto potencial de invasão às plantas são (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005; SANTANA; ENCINAS, 2008; MATOS; PIVELLO, 2009; MURREL et al., 2011; DIAS et al., 2013):

- Generalismo na utilização de recursos e resistência às diferentes variáveis ambientais, ao contrário das nativas - que se tornaram especialistas na ocupação de um determinado nicho ecológico, ficando restritas às suas especificidades;
- Pioneirismo e adaptação às áreas degradadas;
- Alta eficiência fotossintética e no uso dos nutrientes (muitas são heliófilas e têm metabolismo C4);

<sup>14</sup> As chances de sucesso na invasão de novo ambiente são diretamente proporcionais à capacidade do vetor transportador em manter o indivíduo vivo.

- Crescimento rápido e maturação precoce;
- Longos períodos de floração e frutificação;
- Sucesso reprodutivo, com mais de um ciclo por ano, produção em grande quantidade de sementes de pequeno tamanho e eficiência na dispersão das mesmas (anemocoria);
- Formação de banco de sementes com grande longevidade no solo;
- Reprodução por sementes e por brotação; e
- Produção de toxinas biológicas que impedem o crescimento de plantas de outras espécies nas imediações (alelopatia).

Altos níveis de variação genética (JOHNSTON; PIOLA; CLARK, 2009), plasticidade fenotípica (LORENZO; GONZÁLES, 2010) e a ausência de inimigos naturais também são fatores facilitadores ao seu estabelecimento no novo ambiente.

Conforme Ceccon (2013), a contaminação biológica ocorre de formas distintas nos ambientes, visto que uns são mais suscetíveis à invasão do que outros. São aqueles com baixa diversidade (CECCON, 2013), que apresentam similaridade climática e ambiental<sup>15</sup> à região de origem da biota invasora, bem como os que sofreram algum tipo de impacto/degradação (MATOS; PIVELLO, 2009; CECCON, 2013), o que, segundo ZILLER (2001), “explica a rápida adaptação de seus ciclos de germinação e ocupação em novos ambientes que sofrem perturbações naturais ou induzidas”.

Há uma relação positiva direta entre degradação ambiental e suscetibilidade à invasão, tendo em vista que a degradação ambiental diminui a competição interespecífica e aumenta a disponibilidade de recursos, facilitando processos de invasão. Além disso, a fragmentação de habitats aumenta a exposição de áreas naturais à pressão de propágulos de espécies exóticas provenientes de ecossistemas vizinhos degradados e/ou manejados. (ZILLER; DECHOUM, 2013).

Ademais,

Quando ocorre uma perturbação, a superfície do solo sofre uma alteração física e um aumento na exposição à luz, o que, consequentemente, leva a maior flutuação de temperatura que pode aumentar a mineralização de nitrogênio. Estes níveis elevados de recursos favorecem o desenvolvimento das espécies de rápido crescimento e podem conduzir à invasão ou ao crescente domínio de espécies invasoras. (CECCON, 2013, p. 39-40, tradução nossa).

---

<sup>15</sup> Gonçalves (2014) alerta para o fato de que algumas espécies invasoras podem, por meio da variabilidade genética, ocupar áreas com características opostas àquelas apresentadas pelo seu lugar de origem, tornando mais complexa a previsão de novas invasões.

Ecossistemas geograficamente isolados são particularmente vulneráveis (McNEELY et al., 2001). Ambientes abertos, como campos e cerrados, tendem a ser mais facilmente invadidos por espécies arbóreas do que áreas florestais preservadas, visto que estas se encontram saturadas com a alta diversidade da biota residente e com poucas fontes de recursos não utilizadas, reduzindo a probabilidade de invasão.

Desta forma, a invasão é mais comum em áreas com viabilidade flutuante de recursos (pobres em biodiversidade), já que, como dito por Darwin, essas comunidades exploram menos os recursos disponíveis, deixando espaço para especiação; alternativamente, biotas diversificadas possuem habilidades superiores às competitivas como resultado da inovação evolutiva (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005; LORENZO; GONZÁLES, 2010).

### 2.3 O PAPEL DAS INTERAÇÕES BIOLÓGICAS NO PROCESSO DE INVASÃO E SEUS EFEITOS NOS PROCESSOS ECOSSISTÊMICOS

A estrutura e dinâmica das comunidades biológicas são regidas por diversos fatores, como distúrbios, limites à dispersão, disponibilidade de recursos, competição, herbivoria, interações planta-microbiota, entre outros, porém em graus de importância distintos (FOXCROFT, 2013); de acordo com Sax, Stachowicz e Gaines (2005), interações bióticas são os fatores que exercem efeito substancial nessas comunidades.

Espécies exóticas invasoras diferem das nativas em características relacionadas à utilização e estocagem de recursos e estrutura trófica, podendo reduzir a abundância de espécies nativas por meio de relações interespecíficas de competição, parasitismo/predação e interferência reprodutiva que alterem o suprimento de propágulos (KOIKE et al., 2006) ou levem ao surgimento de híbridos<sup>16</sup> ou perda de *pool* gênico (PETENON; PIVELLO, 2008; CECCON, 2013); todavia, podem ocorrer também interações facilitadoras<sup>17</sup>, como o mutualismo reprodutivo, que eleva o sucesso da polinização ou dispersão de propágulos (ex.: vertebrados

---

<sup>16</sup> Caso ocorra o fenômeno de heterose ou vigor híbrido, a linhagem resultante poderá apresentar maior potencial invasor do que seus genitores (FOXCROFT, 2013).

<sup>17</sup> Facilitação pode ser definida como interações positivas diretas entre dois organismos e que beneficiam ao menos um deles, excluindo-se interações tróficas em que uma espécie se beneficia por consumir outra (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005).



nativos que dispersam frutos exóticos), fundamental para a consolidação de espécies invasoras (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005).

Em se tratando de competição por recursos (luz, temperatura, água e nutrientes), espécies invasoras representam múltiplas ameaças à biota residente por “adicionarem mais pressão competitiva ao ambiente, rompendo sua estrutura física e, muitas vezes, introduzindo parasitas ou doenças que dizimam as nativas” (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005, p. 140). A Teoria do Aumento de Competitividade tem sido considerada por muitos autores como o mecanismo primário de invasão; de acordo com ela, diante da ausência de inimigos naturais, os recursos outrora destinados à produção de compostos de defesa passam a ser empregados em estratégias que elevem sua competitividade (UESUGI; KESSLER, 2013); assim, graças à disponibilização de mais recursos para os competidores resistentes, o ecossistema invadido

[...] sofrerá uma série de alterações em propriedades ecológicas essenciais como ciclagem de nutrientes e produtividade vegetal, cadeias tróficas, estrutura, dominância, distribuição e funções de espécies, [...] distribuição de biomassa, densidade de espécies, porte da vegetação [e] acúmulo de serrapilheira [...]. (KOIKE et al., 2006, tradução nossa).

Essas alterações colocam em risco atividades econômicas ligadas ao uso de recursos naturais em ambientes estabilizados, gerando impactos economicamente negativos.

Em âmbito individual, todos os seres vivos estão envolvidos no fluxo e estocagem de matéria, água e energia, fazendo parte do que se define como processos ecossistêmicos. Assim, espécies vegetais podem influenciar consideravelmente o funcionamento dos ecossistemas; segundo Ziller (2001),

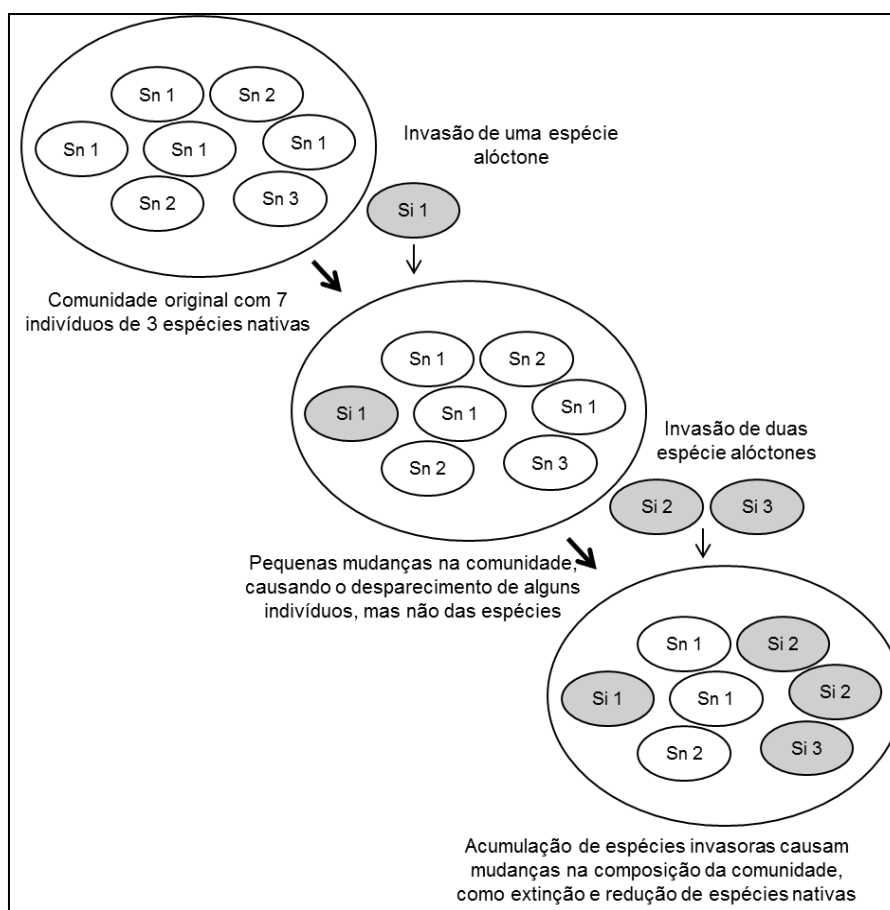
[...] o impacto da contaminação biológica está sendo equiparado [...] ao processo de mudanças climáticas e à ocupação do solo como um dos mais importantes agentes de mudança global por causa antrópica. Além disso, as mesmas espécies exóticas são invasoras de diversos países e sua dominância tende a levar à homogeneização da flora mundial, num lento processo de globalização ambiental.

As principais consequências da invasão em longo prazo são: redução e homogeneização da biota, desestruturação da comunidade, extinção e perda global de diversidade.

Koike e outros (2006) referem-se à homogeneização biológica como processo de evolução reversa, uma vez que leva à perda acelerada da diversidade natural.

A desestruturação da comunidade receptora e consequente extinção de suas formas de vida (figura 03) ocorrem devido à interrupção/mudança na intensidade ou natureza da interação entre as nativas devido à presença do invasor, especialmente se este último é mais vigoroso competitivamente. Por sua vez, a perda global de biodiversidade pode ser atribuída ao maior vigor e capacidade reprodutiva dos invasores, que se dispersam mais e levam suas características a mais ambientes (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005).

**Figura 3** – Diagrama representando as alterações na estrutura de uma comunidade nativa devida à introdução de espécies invasoras - redução e extinção de espécies, levando à homogeneização da biota.  $S_n$  é o número de espécies nativas presentes na comunidade e  $S_i$  é o número de espécies invasoras.



Fonte: KOIKE et al. (2006) – adaptado pelo autor.

Um problema antrópico que pode auxiliar no aumento dos eventos de invasão é a mudança climática, que causa “alterações na distribuição e abundância de espécies

[...], resultado de impactos diretos nos indivíduos, mudanças nos fatores abióticos, nas oportunidades de reprodução e nas interações entre espécies” (McNEELY et al., 2001, p. 10); assim, as interações bióticas podem sofrer mudanças extremas, tornando as espécies nativas suscetíveis à invasão.

### **2.3.1 Alelopatia: Seu desenvolvimento e importância no processo de invasão**

A forma de vida sésil dos vegetais os obrigou a desenvolver, ao longo de sua evolução, eficientes mecanismos que atuassem tanto na defesa contra predadores, quanto na competição por recursos com outras plantas, aumentando suas vantagens adaptativas e permitindo o seu estabelecimento (RASCHER; HAY, 2014); para isso, cada espécie vegetal desenvolveu e aperfeiçoou seu próprio conjunto de compostos de defesa (LARCHER, 2006), cujos efeitos são chamados de toxicidade biogênica ou alelopatia<sup>18</sup>.

Definida como a interferência (direta ou indireta) provocada pela liberação, no ambiente, de substâncias naturais oriundas do metabolismo secundário e que afetam o desenvolvimento de outras plantas (LIMA et al., 2004; RIZVI, 2012), a alelopatia, é uma forma de interação bioquímica entre vegetais e para autores como Rice (apud RIZVI, 2012; CHENG; CHENG, 2015), o termo pode ser extrapolado para os efeitos – benéficos ou maléficos – exercidos por biomoléculas liberadas - também - por microrganismos. Já para a Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS, em inglês), o fenômeno pode ser definido como “[...] qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, fungos ou bactérias, que influencie o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos ou agrícolas” (HE et al., 2012, tradução nossa).

Para outros autores, como Harborne e Almeida (apud PERIOTO, 2003), a alelopatia é um fenômeno extremamente complexo por ser um “componente de interferência, caracterizando-se pela introdução de novos fatores, os compostos químicos, no

---

<sup>18</sup> O termo foi primeiramente usado por Molish em 1937 e deriva do grego *allelon* – mútuo - e *pathos* - prejuízo; contudo, apesar dessa definição, os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um mesmo composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo de sua concentração no meio ambiente (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; ALBUQUERQUE et al., 2011; HE et al., 2012).

meio ambiente, o que a distingue da competição, que se dá pela retirada ou redução de fatores do ambiente”.

A percepção da existência da alelopátia ocorreu desde o início da agricultura; o primeiro registro acerca da fitotoxicidade de uma planta sobre o desenvolvimento de outra ocorreu em 300 a.C, na obra de Theophrastus intitulada *Enquiry into plants*, quando este propôs que *Cicer arietinum* exauria o solo onde se encontrava, limitando o surgimento de outras espécies no local (ALIZADEH, 2011; RIZVI, 2012; REIGOSA et al., 2013). Em 1 d.C, Plínio aventou a teoria de que os problemas na agricultura de sua cidade seriam provocados por outras plantas ali existentes (GATTI, 2003). Documentos japoneses datados de 300 anos descrevem que constituintes químicos das folhas de *Pinus densiflora*, quando lixiviados pela chuva ou orvalho, prejudicavam as culturas sob suas copas.

Em meados do século XIX, De Candolle expôs a teoria de que o esgotamento das terras submetidas há décadas consecutivas de monocultura era resultado do acúmulo de aleloquímicos<sup>19</sup> exsudados pela cultura, afetando seu próprio desenvolvimento (ALIZADEH, 2011); outros trabalhos da época reportaram a influência negativa de uma espécie de noqueira sobre as plantas vizinhas (BLANCO, 2007).

No início do século XX, Cowels pautou os efeitos das toxinas vegetais como fator norteador à sucessão ecológica (RIZVI, 2012); Scczepanski, em 1977, devido à amplitude do conceito *alelopátia*, o dividiu em três categorias distintas:

*Alelospolia* ou competição, onde organismos provocam a retirada ou redução de fatores do ambiente, como água, etc., [...]; *alelomediação* ou interferência indireta, onde as alterações são causadas no ambiente por organismos, com reflexo nos seres vizinhos, como a escolha seletiva de um herbívoro; e *alelopátia* [propriamente dita], interferência causada por substâncias químicas produzidas por certos indivíduos e que no ambiente afetam outros [membros] da comunidade. (PIRES; OLIVEIRA apud GATTI, 2003).

Essa diferenciação entre alelopátia e competição é corroborada por diversos autores, embora também reconheçam que ambos os fenômenos podem estar intimamente relacionados, uma vez que, ao afetar o crescimento de uma planta

<sup>19</sup> Termo primeiramente cunhado por Wittaker e Feeny em 1971, sendo definido como agentes químicos de importância essencial para a adaptação de espécies e organização das comunidades (CORREIA et al., 2008).

vizinha, aquela que liberou o aleloquímicos no ambiente pode se beneficiar na competição por recursos (REIGOSA et al., 2013). Para Ferreira e Áquila (2000) e Ferreira e Borghetti (2004), a competição se distingue da alelopatia por ser influenciada por fatores abióticos, enquanto a última é uma resposta a fatores bióticos:

Na natureza, alelopatia pode ser confundida com competição, [todavia], o efeito alelopático consiste na liberação de um composto químico pela planta no ambiente, ao passo que competição é a remoção ou redução de um fator ambiental [necessário à outra planta], tal como água, luz, minerais, etc. (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Em 1978, Putnam e Duke introduziram os termos *planta doadora* (aquela que libera substâncias químicas) e *planta receptora* (afetada pelos compostos lançados por outro vegetal doador), relatando que a principal função dos produtos secundários é a proteção dos organismos que os produzem e que uma mesma substância poderia desempenhar inúmeras funções, dependendo de sua concentração, rotas de translocação e liberação (DANDELOT et al., 2008).

Na tentativa de melhor classificar a alelopatia, Miller (em 1996) a desmembrou em *autotoxicidade*, efeito dos exudados vegetais sobre a mesma espécie da planta que os liberou; e *heterotoxicidade*, quando uma planta produz substâncias que influenciarão o desenvolvimento de outra espécie vegetal. A vantagem da primeira seria manter o espaçamento entre indivíduos para prevenir o desenvolvimento de predadores e patógenos, bem como promover polinização cruzada (GATTI, 2003).

Somente no final do século XX, contudo, é que o estudo da alelopatia se desvinculou de seu caráter agrônomo para demonstrar seu papel no estabelecimento da estrutura de uma floresta e sua influência nas variações ambientais e demais relações ecológicas; todavia, sua importância no processo de invasão biológica começou a ser explorada apenas recentemente pelos pesquisadores (MEINERS; KONG, 2012), que buscam determinar o modo de ação para essa interação, bem como demonstrar sua contribuição na habilidade de algumas espécies exóticas em se tornarem dominantes na comunidade invadida (MATHIAS et al., 2015).

Muito do sucesso da invasão vegetal está relacionado à bioquímica. As plantas liberam acima de 50% do total de produtos fotossintéticos como exsudado orgânico pelas raízes. Estes possuem um papel mutualístico ou

defensivo e geram uma gama de respostas positivas ou negativas nas condições bióticas e abióticas da rizosfera. (SAX; STACHOWICZ; GAINES, 2005, tradução nossa).

Conforme Inderjit (2011) e Cheng e Cheng (2015), a interação alelopática pode ser significativa para a distribuição e abundância da comunidade vegetal, bem como para o sucesso de espécies invasoras; tal ideia se baseia em duas premissas: o estabelecimento de monoculturas pelos invasores em um local onde antes havia diversidade e a falta de adaptação da biota residente aos compostos produzidos pelas espécies introduzidas (HIERRO; CALLAWAY, 2003), conferindo a estas vantagens adaptativas que facilitarão seu estabelecimento (LI et al., 2010; FABBRO; PRATI, 2015). Essa última premissa é conhecida como a *Teoria de novas armas* (Novel weapons hypothesis, em inglês), segundo a qual as espécies invasoras bem-sucedidas se tornam abundantes no ambiente invasor devido à liberação de compostos com efeitos inibitórios na biota residente, mas que são relativamente ineficazes contra seus vizinhos naturais, que tiveram tempo para evoluir e se adaptar<sup>20</sup> (ALBUQUERQUE et al., 2011; INDERJIT, 2011; MURREL et al., 2011; MATHIAS et al., 2015);

Para Sax, Stachowicz e Gaines (2005), a atuação dos aleloquímicos na invasão vai além, fornecendo vantagens àquelas espécies que possuam necessidades de recursos similares às nativas, auxiliando na eliminação dos competidores.

#### 2.3.1.1 Metabólitos Secundários

O metabolismo vegetal pode ser dividido em *primário*, onde são produzidas substâncias essenciais ao desenvolvimento da planta, e *secundário*, cujos produtos originados (metabólitos secundários ou aleloquímicos) não possuem relação direta com a saúde vegetal<sup>21</sup>, porém são oriundos do carbono fixado na fotossíntese e desempenham papéis importantíssimos no sucesso evolutivo dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2013; CARRANO-MOREIRA, 2014), sendo, segundo Simões e outros, indispensáveis à sobrevivência das espécies que os sintetizam. Evolutivamente, são

---

<sup>20</sup> Pelo mesmo princípio, as espécies nativas também podem exercer alelopatia sobre as exóticas, resistindo à invasão; é a hipótese do lar seguro, ou *Homeland Security Hypothesis*, em inglês (CUMMINGS; PARKER; GILBERT, 2012).

<sup>21</sup> Na verdade, alguns metabólitos secundários possuem papel importantíssimo em funções vitais das plantas; um exemplo é o hormônio giberelina, imprescindível ao desenvolvimento desses organismos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

produtos originados por mutações<sup>22</sup> e, por proporcionarem vantagens aos seus produtores em relação aos seus vizinhos que não os possuíam, foram selecionados pela seleção natural (BORELLA et al., 2012).

São produzidos por todas as plantas em vários níveis de concentração, diversidade e composição (REIGOSA et al., 2013), sendo – porém - específicos às espécies ou grupo vegetal (SIMÕES et al., 2017); sua síntese irá variar em relação ao órgão produtor, estágio do ciclo de vida, estações do ano, estado nutricional, estresse biótico e abiótico (LARCHER, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2011; SIMÕES et al., 2017) e presença de patógenos, competidores e predadores (INDERJIT, 2011; MEINERS et al, 2012). Segundo Hierro e Callaway (2003), a disponibilidade de recursos é um dos fatores determinantes para a produção desses compostos.

Para Meiners e outros (2012), a variabilidade genética atuará adequando a quantidade e tipologia de compostos produzidos às condições locais, promovendo a adaptação vegetal; ambientes com limitação de recursos ou fisiologicamente estressantes, por exemplo, demandarão a síntese de aleloquímicos específicos para sobrevivência nas condições apresentadas e as variedades aptas serão selecionadas.

A grande variedade de estruturas dos compostos secundários pode ser explicada por duas hipóteses:

Uma [...] tem como base o modelo da coevolução química, que sugere que cada metabólito secundário teve ou tem uma atividade biológica no curso da evolução. Paralelamente, existe a hipótese da seleção por triagem, que se fundamenta no fato de que organismos com potência metabólica alta mantêm a diversidade de formação de metabólitos especiais, o que gera uma vantagem evolutiva (SIMÕES et al., 2017, p. 151).

Assim, segundo a teoria de seleção por triagem, o metabólito que conferir maior vantagem adaptativa será selecionado ao longo da evolução e terá sua rota de produção aumentada.

A efetividade dos aleloquímicos é modulada por interações competitivas (FABBRO; PRATI, 2015) e, para que possam exercer seus efeitos na planta alvo, precisam ser

---

<sup>22</sup> Os primeiros compostos secundários eram basicamente protetores, como resinas, ligninas e flavonoides; com a evolução das angiospermas e o surgimento das espécies herbáceas, os tipos de produtos secundários foram ampliados (LARCHER, 2006).

liberados da planta doadora, o que pode ser feito das seguintes maneiras (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; ALIZADEH, 2011; ZENG, 2014; JABRAN et al., 2015):

- Lixiviação de folhas e caules vegetais;
- Volatilização de compostos fitotóxicos;
- Liberação por decomposição de partes vegetais e serrapilheira; e
- Exsudação radicular.

De fato, como He e colaboradores (2012) alertam, os efeitos alelopáticos dos metabólitos secundários não influenciam isoladamente os ecossistemas naturais, mas se correlacionam diretamente com uma gama de outros processos ecofisiológicos, como competição e facilitação, o que determinará sua intensidade. Assim, em um ambiente natural, com diversos tipos de ameaças, as reações de defesa vegetal dependerão diretamente da forma como múltiplos processos ecológicos interagem simultaneamente para afetar a expressão dos aleloquímicos (INDERJIT, 2011; MEINERS; KONG, 2012).

Dentre as diversas substâncias químicas com propriedades alelopáticas, destacam-se compostos pertencentes aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarina, saponinas, glicosídeos, terpenos, alcaloides, esteroides e flavonoides (SIMÕES et al., 2017). Na maioria dos casos, esses compostos não causam nenhum efeito sobre a planta-alvo, pois são liberados sozinhos e em baixas concentrações (SOUZA et al., 2002). Whittaker (apud GATTI, 2003) defende que, nas células vegetais, os aleloquímicos ficam isolados nos vacúolos, a fim de evitar sua própria autotoxicidade; somente quando estão em grande quantidade e/ ou em interação com vários aleloquímicos é que a alelopatia se estabelece.

Sob circunstância normal, diferentes moléculas são simultaneamente liberadas no ambiente. [...] a interação química entre plantas quase nunca é limitada a um composto, mas geralmente resulta de uma mistura complexa de várias delas, [...] que podem ter efeito sinérgico ou antagônico e pode ser modificada pelas propriedades químicas, físicas e bióticas do solo. (REIGOSA et al., 2013, tradução nossa).

Pode-se dizer que os metabólitos secundários fazem da alelopatia um importante mecanismo ecológico (GATTI; PEREZ; FERREIRA, 2007; LI et al., 2010), visto que exercem inúmeras funções ecológicas diretas e indiretas que vão muito além do



combate a patógenos e predadores (INDERJIT, 2011); diretamente, são responsáveis pela prevenção da decomposição das sementes, influem no crescimento e metabolismo vegetal (PERIOTO, 2003) e na dormência das gemas, atraem polinizadores e dispersores de sementes (TEIXEIRA et al., 2005; INDERJIT et al., 2011), atuam como agentes transportadores de metais e agentes de simbiose entre microrganismos do solo e planta (LORENZO; GONZÁLES, 2010). Os efeitos indiretos, por sua vez, incluem alterações nas características nutricionais do solo, ciclagem de nutrientes (KAUR et al., 2012) e modificação da microbiota do solo (TEIXEIRA et al., 2005; MEINERS et al., 2012).

Por mais pontuais que sejam as alterações provocadas pelos aleloquímicos, em se tratando de interferência no metabolismo rotas inteiras podem ser alteradas, haja vista os inúmeros controles do tipo feedback envolvidos nas reações metabólicas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

É fundamental, contudo, ter em mente que os efeitos visíveis dos fitoquímicos sobre o organismo vegetal, como alterações na capacidade germinativa e no desenvolvimento, representam apenas uma sinalização secundária de mudanças anteriores; desta forma, interferências sobre germinação e/ou desenvolvimento espelham eventos ocorridos a nível celular e molecular (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; BORELLA et al., 2012; MORAES et al., 2014), como: inibição da divisão e alongação celular, modificações na micro e macroestrutura citológica, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e inibição de enzimas antioxidantes, impedindo sua ação no combate ao estresse oxidativo, aumento na permeabilidade da membrana celular, alteração na produção de promotores de crescimento, alteração da funcionalidade enzimática, na respiração e captação de água e nutrientes, inibição ou danos no aparato fotossintético e aceleração da decomposição de pigmentos fotossintéticos, influência na síntese de DNA e proteínas associadas (PELLISSIER, 2013; CHENG; CHENG, 2015).

#### 2.3.1.2 A germinação como avaliação da alelopatia

O processo de germinação é suscetível a inúmeras interferências abióticas (competição) ou bióticas (alelopatia) que podem retardar ou inibir sua ocorrência (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). A maioria das pesquisas em alelopatia refere-se

aos efeitos sobre a germinação e o crescimento vegetal (PELLISSIER, 2013), desconsiderando os efeitos celulares e moleculares relacionados às mudanças fisiológicas.

Segundo Ferreira e Borghetti (2004) e Maraschin-Silva e Áquila (2006), a germinação é menos sensível aos aleloquímicos quando comparado a aspectos do crescimento da plântula, porém muito mais fácil de ser observado (a semente germina ou não). Como citado por Stein et al. (2008), a germinação

[...] compreende uma sequência de eventos fisiológicos, influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes; cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais. Em síntese, [...] germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica.

Por constituir a fase mais sensível da ontogênese (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), é fundamental que os aspectos de desenvolvimento radicular (comprimento, anomalias, etc.) também sejam avaliados e associados às alterações da divisão celular, a fim de obter dados mais concretos sobre a influência alelopática dos metabólitos. Se o foco do estudo se restringir à germinabilidade, negligenciando-se os possíveis efeitos sobre o desenvolvimento inicial das plântulas (como necrose radicular), corre-se um sério risco de se subestimar a alelopatia. Ademais, “muitas vezes, o efeito alelopático não se dá sobre a germinabilidade (percentual final de germinação), mas sobre a velocidade de germinação ou [...] outro parâmetro do processo” (FERREIRA; BORGHETTI, 2004, p. 253), como tempo médio de germinação, velocidade média de germinação, entre outros.

Considerando a complexidade do processo de germinação, deve-se atentar para a possibilidade de ocorrência de dormência<sup>23</sup> nas sementes submetidas ao teste, o que exigirá tratamento prévio para sua superação.

De todos os fatores, a água é o que mais influencia o processo germinativo; uma vez que o movimento da água para o interior da semente ocorre graças à capilaridade e difusão, indo do maior para o menor potencial hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2013;

---

<sup>23</sup> Definida como incapacidade temporária de germinação em resposta às condições ambientais, a dormência é causada por um bloqueio na própria semente, visando à ocorrência da germinação em condições favoráveis, elevando as chances de sobrevivência do indivíduo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

LARCHER, 2006), com a embebição, ocorre a reidratação dos tecidos e, consequentemente, a intensificação das atividades metabólicas, como

[...] aumento na atividade respiratória, síntese e consumo de ATP, síntese de proteínas e de mRNAs e ativação de enzimas. Isso resulta no início da mobilização de reservas, entre outros processos, o que envolve o acúmulo de solutos e subsequente entrada de água nas células, cuja expansão culmina no alongamento embrionário [...] e a protrusão de uma das partes do embrião para fora da semente reflete, sob um ponto de vista metabólico, o final da germinação (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Por outro lado, o excesso de umidade tende a provocar decréscimo na germinação, visto que impede a penetração do oxigênio e reduz todo o processo metabólico resultante (STEIN et al., 2008).

Para os estudos com alelopatia, os bioensaios costumam utilizar sementes de organismos-teste como alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*), por serem altamente sensíveis às diferentes concentrações de aleloquímicos, mesmo que estas sejam baixas, por terem germinação rápida, em aproximadamente 24h, possibilitando obtenção de respostas em curto período experimental, além de crescimento linear e ampla tolerância às variações de pH (MAIRESSE et al., 2007, STEIN et al., 2008).

## 2.4 A CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA NA AMÉRICA LATINA: ASPECTOS AMBIENTAIS E LEGISLATIVOS

Os estudos referentes à disseminação de espécies invasoras nos ecossistemas tropicais ainda são esparsos; Rodriguez (apud PETENON; PIVELLO, 2008) afirma que a real dimensão do fenômeno da invasão na América do Sul, não está refletida na literatura atual. Com isso, cria-se uma lacuna na compreensão dessa ameaça, o que dificulta a elaboração e/ou inviabiliza a execução de ações de manejo nesses locais.

Sax, Stachowicz e Gaines (2005) alertam para o fato de que, mesmo detentora de uma das maiores biodiversidades do planeta, a América do Sul tem ignorado a presença e os impactos de espécies exóticas invasoras; o agravante é que, de acordo com a rede temática sobre espécies exóticas invasoras I3N - *IABIN Invasives Information Network* (acesso em 16 dez. 2015), as poucas informações existentes são, em sua maioria, inacessíveis, não confiáveis ou incompatíveis com outros

dados. Não está claro o número de espécies invasoras no continente, embora seja possível encontrar informações para alguns de seus países (KOIKE et al., 2006).

Conforme Galindo-Leal e Câmara (2005), a América do Sul experimentou três fenômenos principais de invasão biótica, responsáveis por modificar drasticamente sua fauna e flora: o primeiro há aproximadamente três milhões de anos, quando o surgimento do istmo do Panamá permitiu a entrada da vida silvestre vinda da América do Norte; o segundo com a migração do *Homo sapiens* vindo da Ásia, há aproximadamente 10-15 mil anos; e o último há 500 anos, com a chegada dos europeus.

Atualmente, a rápida expansão do comércio aliada às mudanças no uso do solo e no clima desencadearam a quarta onda de invasão (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005), cuja velocidade, diversidade e volume de invasores não têm precedentes históricos. Conforme o continente avança em direção ao desenvolvimento econômico, a globalização exige o constante crescimento dos centros urbanos, que progridem por território antes ocupados por florestas, modificando-os e gerando condições propícias ao estabelecimento de espécies alóctones (McNEELY et al., 2001).

De modo geral, a legislação internacional é silenciosa, para não dizer omissa, quanto às espécies exóticas invasoras, não tendo eficácia em combatê-las, uma vez que são geralmente inconsistentes ou restritas a certas espécies (KOIKE et al., 2006), como é o caso da Convenção Internacional sobre o Controle e Manejo da Água de Lastro e Sedimentos Carregados por Navios (SECRETARIAT OF CBD, 2001).

Em termos gerais, se observa uma ausência de princípios, procedimentos e critérios claros para analisar os riscos e encarar a erradicação e controle abarcando todos os grupos taxonômicos. Um ordenamento jurídico adequadamente delineado é essencial para prevenir ou reduzir ao mínimo o risco de introdução não desejada e prover base sólida para o estabelecimento de medidas de erradicação e controle eficazes (SHINE; WILLIAMS; GÜNDLING, 2000).

A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), assinada em 1992, objetiva

[...] a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, mediante, inclusive, o acesso adequado aos recursos genéticos e a transferência adequada de tecnologias pertinentes, levando em conta todos os direitos sobre tais recursos e tecnologias, e mediante financiamento adequado (BRASIL, 2000).

Tendo sido um respeitável marco no que tange à importância de considerar a biodiversidade nos assuntos governamentais (SIMÕES et al., 2017), a CDB - em seu art. 7º, alínea c - determina que as partes contratantes deverão tomar as medidas necessárias para “identificar processos e categorias de atividades que tenham ou possam ter sensíveis efeitos negativos na conservação e na utilização sustentável da diversidade biológica [...]”, enquanto no art. 8º, alínea h, especifica a necessidade de “impedir que se introduzam, controlar ou erradicar espécies exóticas que ameacem os ecossistemas, habitats ou espécies” (BRASIL, 2000); entretanto, as diretrizes sobre sua implementação são vagas.

Na Conferência das Partes (COP) signatárias da CDB, o tema das espécies exóticas é oficialmente reconhecido como tendo impactos negativos na biodiversidade e economia, sendo elaborado, em sua quinta reunião, o guia de princípios, para a prevenção, introdução e mitigação dos impactos de espécies exóticas (SECRETARIAT OF CBD, 2010). As Metas de Aichi de Biodiversidade, elencadas na décima reunião da COP, estabelecem (Meta 9) que “até 2020, espécies exóticas invasoras e seus vetores terão sido identificadas e priorizadas, espécies prioritárias terão sido controladas ou erradicadas, e medidas de controle de vetores terão sido tomadas para impedir sua introdução e estabelecimento” (BRASIL, acesso em 19/12/15a).

A Estratégia Global para a Conservação de Plantas (GSPC, na sigla em inglês) estabelece, em sua meta 10, que deverá ocorrer até 2020 a efetivação de planos de controle de, no mínimo, 100 das principais espécies exóticas invasoras que ameaçam as plantas, as comunidades de flora e os habitats e ecossistemas associados (MARTINELLI; MORAES, 2013).

A Convenção Global de Espécies Migratórias (CMS na sigla em inglês) e a Convenção Internacional para a proteção das plantas (IPPC na sigla em inglês) são outros exemplos de acordos assinados por diversos países que fazem referência à questão da invasão biológica (McNEELY et al., 2001). Este último em especial pretende estabelecer ações eficazes na prevenção da introdução e dispersão de

patógenos vegetais e produtos de origem vegetal (SECRETARIAT OF CBD, 2001; KOIKE et al., 2006)<sup>24</sup>.

Apesar da CDB orientar seus membros a adotarem o princípio da precaução nas tomadas de decisões acerca da biodiversidade (BRASIL, 2006a), ainda há programas governamentais em diversos países (sobretudo no continente americano) que promovem o cultivo de espécies exóticas por meio de novas introduções e da intensificação de uso de espécies já consagradas como invasoras, sem prever manejo adequado ou medidas preventivas ao processo de invasão.

Essas atitudes denotam falta de uso da base científica para o desenvolvimento, assim como falta de bom senso no manejo de ecossistemas naturais e do uso do princípio da precaução em que se fundamenta a Convenção Internacional sobre Diversidade Biológica (MATTHEWS, 2005).

Algumas iniciativas vêm tentando reverter o quadro acima; a Rede Inter-Americana de Informação sobre Biodiversidade (IABIN), criada por países do continente americano, lançou em 2001 a I3N (BASE DE DADOS NACIONAL DE ESPÉCIES EXÓTICAS INVASORAS I3N BRASIL, acesso em 16 dez. 2015). Em 2004, ocorreu a publicação, pela IUCN, de lista contendo as 100 espécies mais invasoras do mundo (LOWE, et al., 2004; DUARTE; THIENEL, 2013). A ONG The Nature Conservancy (TNC) desenvolve, em parceria com o Instituto Horus, o Programa de espécies exóticas invasoras para América do Sul. O periódico *Bioinvasiones*, dedicado às invasões biológicas na América Latina e Caribe, surgiu em 2011 com o objetivo de “estimular e consolidar a interação entre pesquisadores dedicados ao estudo das plantas exóticas invasoras na América Latina e Caribe” (BIOINVASIONES, acesso em 16 dez. 2015, tradução nossa).

É inegável que a complexa questão das espécies invasoras necessita de uma abordagem coordenada, multifacetada e interdisciplinar, pois, conforme Smith, Bazely e Yan (2011), a solução só será obtida quando as esferas ecológica, econômica e social adotarem uma linguagem consonante.

---

<sup>24</sup> Instituições internacionais como Grupo de Especialistas em Espécies Invasoras, Programa Global de Espécies Invasoras (GISP em inglês) e Rede Global de Informações sobre espécies Invasoras (GISIN em inglês) possuem cientistas americanos entre seus colaboradores e tentam compilar os conhecimentos existentes, além de promoverem estudos para ampliá-los (SECRETARIAT OF CBD, 2001; LOWE et al., 2004).

### 2.4.1 Situação brasileira

Detentor de dois<sup>25</sup> dos maiores hotspots mundiais de biodiversidade e responsável por um sexto da riqueza da flora do planeta, o Brasil ainda engatinha na questão das espécies invasoras (ZENNI; ZILLER, 2011), embora avanços consideráveis tenham ocorrido nos últimos anos.

Os principais centros urbanos e, consequentemente, os maiores polos industriais do país, localizam-se em um desses hotspots - o bioma Mata Atlântica, que abriga cerca de 70% da população brasileira; tal fato agrava de forma considerável as ameaças à sua biota (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005) e torna este o bioma mais degradado e, portanto, o mais afetado por espécies exóticas invasoras, inclusive em Unidades de Conservação (SAMPAIO; SCHMIDT, 2013).

O primeiro registro no país de invasão por uma espécie alóctone pertence às gramíneas forrageiras introduzidas no início do século XVIII como alimento para o rebanho bovino (ZENNI; ZILLER, 2011); todavia, as espécies exóticas iniciaram sua entrada no território brasileiro ainda no período colonial para fins econômicos e alimentar (OLIVEIRA; MACHADO, 2009). No início do século XIX, dois decretos reais (em julho de 1809 e julho de 1810) ofereciam bônus e isenção de impostos para todos que introduzissem plantas de valor econômico (ZENNI; ZILLER, 2011).

Ainda mantendo o status de importante setor econômico, a agricultura<sup>26</sup> atual continua dependente de diversas espécies alóctones, muitas com potencial invasor reconhecido, como as gramas do gênero *Urochloa* (BRASIL, 2011c).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2011c), 24% das espécies exóticas existentes no Brasil foram introduzidas para uso ornamental, 14% para fins de melhoramento genético, 13% como espécies forrageiras (dentre elas acácia e leucena) e 9% para uso florestal.

Como país tropical, o Brasil é altamente vulnerável à invasão biológica, uma vez que oferece condições climáticas favoráveis e substrato suscetível (SANTANA;

---

<sup>25</sup> Mata Atlântica e Cerrado (MYERS et al., apud ZENNI; ZILLER, 2011).

<sup>26</sup> O controle das espécies exóticas invasoras no país está direcionado para potenciais pragas agrícolas com o propósito de proteger o setor econômico do país (BRASIL, 2011c).

ENCINAS, 2008). Além disso, a urbanização cresce em ritmo alarmante, gerando imensos problemas ambientais, como a degradação de habitats, facilitando a ocorrência de novos eventos de invasão biológica (BIONDI; PEDROSA-MACEDO, 2008).

Os biomas costeiros, bem como aqueles localizados nas regiões mais populosas e com produção rural intensa (Mata Atlântica, Cerrado e Pampa) são os mais invadidos, (BRASIL, 2011c), corroborando a premissa de que ambientes mais perturbados se tornam mais suscetíveis à invasão.

A ótica ambiental da contaminação biológica só ganhou a real atenção dos pesquisadores brasileiros a partir da década de 1990, mas as poucas informações já levantadas estão repletas de lacunas.

Trata-se de um conhecimento com incertezas básicas sobre o número de espécies exóticas invasoras no país, uma decorrência da inexistência de inventário completo de biodiversidade, da efetiva distinção das espécies exóticas causadoras de impactos e da intensidade com que o processo de introdução ocorre atualmente no país (OLIVEIRA; MACHADO, 2009)<sup>27</sup>.

Uma pesquisa no periódico latino-americano *Bioinvasiones* retornou apenas três artigos brasileiros publicados nos cinco números existentes (BIOINVASIONES, acesso em 16 dez. 2015). Poder-se-ia pensar que essa escassez fosse atribuída ao lançamento recente da revista; porém em uma investigação mais profunda pelos principais periódicos da área até 2012, Dias e outros (2013) identificaram um total de 124 trabalhos reportando espécies invasoras no Brasil, dos quais apenas 51,6% estavam em periódicos científicos reconhecidos. Como se já não fosse alarmante o suficiente quase metade dos estudos realizados não estarem acessíveis à comunidade científica, os autores identificaram também que apenas 4% das espécies relatadas como invasoras nessas publicações tinham embasamento científico (estudos sobre o potencial de dispersão, características ecofisiológicas, etc.), sendo o restante definido como tal apenas por relatos informais<sup>28</sup>.

---

<sup>27</sup> O sul do país é a região mais avançada no conhecimento da invasão biológica; há uma série de instrumentos legais pertinentes ao tema e o Paraná está na terceira edição da Lista Oficial de Espécies Exóticas Invasoras do estado (Portaria 059 de 15 de abril de 2015) (INSTITUTO HORUS, acesso em 16 dez. 2015).

<sup>28</sup> Segundo Sandvik e outros (2013), as lacunas existentes nas pesquisas representam um risco, uma vez que pode ocorrer uma detecção tardia de novas invasões.



Esses fatos explicam a ausência de um diagnóstico completo da ameaça da contaminação biológica no país, embora diversas instituições estejam trabalhando para reverter o panorama negativo. Em colaboração com o Instituto Horus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental, o site da I3N disponibiliza uma lista<sup>29</sup> com 436 espécies exóticas cujo potencial invasor já foi cientificamente registrado para os biomas brasileiros (I3N, acesso em 16 dez. 2015); no site é possível obter, além de informações gerais sobre a espécie pesquisada, dados sobre taxonomia, risco de invasão, manejo, ocorrência, projetos existentes e bibliografia. Entretanto, Zenni e Ziller (2011) atentam para o fato de que o registro de ocorrência na lista não reflete dados sobre tamanho populacional e densidade de áreas invadidas, uma vez que ainda são aspectos que carecem de estudos.

No âmbito legislativo, o Brasil necessita de muitos avanços no desenvolvimento de um arcabouço legal consistente, sem lacunas, conflitos e menos frágil do que o cenário atual, cujas políticas existentes são ineficazes em regular as atividades econômicas que se baseiam no uso de espécies invasoras (ZENNI; ZILLER, 2011; BRASIL, 2011c).

Somente a partir da década de 1960 [...] o problema passa a ser observado sob a perspectiva ambiental, tendo como importantes instrumentos a [...] Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981 (Política Nacional de Meio Ambiente) e a Lei 5.179, de 3 de janeiro de 1967 (Lei de Proteção da Fauna). [...] O arcabouço institucional brasileiro caracteriza-se, portanto, pela divisão de responsabilidades entre diversas instituições e agências cujas atuações são, em alguns casos, concorrentes ou assumem papéis inversos àqueles para os quais foram criados (OLIVEIRA; MACHADO, 2009).

Em 3 de fevereiro de 1994, por meio do Decreto nº 2, o país assumiu o compromisso legal de aplicar o texto da CDB em seu território, inclusive o artigo 8 h, transposto para o art. 61 da Lei de Crimes Ambientais (Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998), onde atesta ser crime ambiental a disseminação de espécies que possam causar danos aos componentes do ecossistema (THE NATURE CONSERVANCE, 2009).

O Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC – (Lei 9.985, de 18 de julho de 2000), em seu art. 31, proíbe a introdução de espécies não autóctones em

---

<sup>29</sup> Utiliza os critérios de classificação definidos pela CDB e é produto da coleta de dados desde 2003.

Unidades de Conservação (BRASIL, 2011b); a Resolução CONAMA n° 429/11<sup>30</sup>, que dispõe sobre metodologia de recuperação das áreas de preservação permanente – APP, determina que a recuperação de APP só poderá ser feita com espécies nativas (art. 3°) e que deverão ser adotadas medidas de controle e erradicação das espécies invasoras de modo a não comprometer o processo de recuperação - art. 4°, inciso II e art. 5°, inciso III (BRASIL, 2011a).

Como país signatário da CDB, o Brasil promoveu em 2001 a *Reunião de Trabalho sobre Espécies Exóticas Invasoras*, cujas conclusões ratificaram a necessidade de maior esforço para a prevenção e controle dos impactos de espécies exóticas invasoras sobre os ecossistemas naturais e alertou para a necessidade de promover a cooperação entre os órgãos agrícolas, florestais, pesqueiros e ambientais, de modo a unificar o tratamento dessa questão e harmonizar as legislações (BRASIL, 2006b).

Como forma de implementar a CDB, foi elaborada em 2002 a Política Nacional da Biodiversidade (Decreto N° 4.339/2002); no ano seguinte, diante da constatação da precariedade de referências bibliográficas e de pesquisas no Brasil relacionadas ao tema, o Ministério do Meio Ambiente publicou o “Primeiro Informe Nacional sobre Espécies Exóticas Invasoras, primeiro diagnóstico nacional sobre distribuição das espécies exóticas invasoras e a capacidade do país para tratar o problema” (BRASIL, 2006b); os resultados estimularam a realização do *I Simpósio Brasileiro de Espécies Exóticas Invasoras*, em 2005.

Em 2006 foi instituída a *Câmara Técnica Permanente sobre Espécies Exóticas Invasoras* por meio da Deliberação da Comissão Nacional de Biodiversidade (CONABIO) n° 049, de 30 de agosto de 2006, responsável pela formulação e implementação da *Estratégia Nacional sobre Espécies Exóticas Invasoras*, publicada pela Resolução n° 005/09, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, acesso em 26 dez. 2015b) e que consiste em

[...] um importante instrumento para a internalização e implementação no país do artigo 8 (h) da Convenção sobre Diversidade Biológica. Da mesma forma, a Estratégia se traduz em uma efetiva ferramenta que o país dispõe para a consecução das determinações das Decisões V/8, VI/23 e IX/4, das

---

<sup>30</sup> Devido à promulgação do novo código florestal, deverá haver uma revisão em todas as CONAMAS a ele relacionadas.

Conferências das Partes, da CDB, quando foram tratadas, em profundidade, as complexas questões relacionadas às espécies exóticas invasoras (BRASIL, acesso em 26 dez. 2015b).

O objetivo da *Estratégia* trata da prevenção e mitigação dos impactos negativos das espécies invasoras sobre a população humana, economia, meio ambiente e biodiversidade (MARTINELLI; MORAES, 2013); em meio as suas diretrizes está, dentre outras ações, a elaboração de legislação pertinente.

Apesar de ser um dos poucos países da América Latina a adotar oficialmente uma estratégia para assuntos da biodiversidade (IUCN; WWF-BRASIL; IPÊ, 2011), a solução para a contaminação biológica no território brasileiro está longe de ser encontrada devido aos conflitos existentes nas legislações vigentes. Um exemplo é a comparação entre a *Estratégia Nacional sobre Espécies Exóticas Invasoras* e a Lei 12.651, de 25 de maio de 2012; enquanto a primeira busca a eliminação, mesmo que em longo prazo, dessas espécies, o Novo Código Florestal ignora o problema ao permitir, em seu art. 61-A, § 13 - inciso IV, o plantio de espécies exóticas em APP:

Art. 61–A. Nas Áreas de Preservação Permanente, é autorizada, exclusivamente, a continuidade das atividades agrossilvipastoris, de ecoturismo e de turismo rural em áreas rurais consolidadas até 22 de julho de 2008.

[...]

§ 13. A recomposição de que trata este artigo poderá ser feita, isolada ou conjuntamente, pelos seguintes métodos:

[...]

IV – Plantio intercalado de espécies lenhosas, perenes ou de ciclo longo, **exóticas**<sup>31</sup> com nativas de ocorrência regional, em até 50% (cinquenta por cento) da área total a ser recomposta, no caso de imóveis a que se refere o inciso V do *caput* do art. 3º;

[...]. (BRASIL, 2012, grifo nosso).

Em relação ao cumprimento da Meta de Aichi nº 9, poucos avanços foram obtidos (IUCN; WWF-BRASIL; IPÊ, 2011), o que ressalta a urgência na “padronização” das legislações, a fim de que falem a mesma linguagem e abordem a problemática de uma mesma forma para que progressos ocorram no combate a esse problema.

---

<sup>31</sup> Nota-se um descaso quanto à possibilidade de espécies exóticas desenvolverem potencial invasor.

## 2.4.2 Panorama no Espírito Santo

Originalmente, 100% do território capixaba eram cobertos pelo bioma Mata Atlântica e seus ecossistemas associados; a monocultura cafeeira do final do século XIX e a indústria de papel e celulose que surgiu na metade do século XX (IBF, acesso em 22 dezembro 2015) contribuíram consideravelmente para a destruição das matas nativas (IPEMA, 2005). Segundo o último levantamento da ONG SOS Mata Atlântica (acesso em 22 dez. 2015), restam apenas 10,5% de cobertura vegetal nativa.

De acordo com Brasil (2006c), o Espírito Santo é um dos poucos estados brasileiros a possuir certo grau de sistematização do conhecimento de sua biota com a publicação de Listas Oficiais e Livros Vermelhos da flora e fauna ameaçadas de extinção; todavia, no tocante à contaminação biológica, o cenário caracteriza-se por apatia e negligência. Ao contrário do recomendado pela ONG The Nature Conservancy (2009) e por diversos especialistas, a legislação estadual não apresenta um tratamento unificação à questão das invasoras e, para piorar, os órgãos que tratam de meio ambiente possuem entendimentos distintos quanto ao assunto, chegando - muitas vezes - a ignorar o problema. Um exemplo alarmante é o projeto coordenado pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER que está introduzindo espécies de outros biomas e países no território capixaba com o objetivo de utilizá-las para reflorestamento (GAZETAONLINE, acesso em 10 jul. 2015), ignorando por completo o princípio da precaução da CDB.

No que tange ao Instituto Estadual de Meio Ambiente – IEMA, a equipe da Comissão de Recuperação de Ecossistemas – CORE elaborou e publicou no sítio eletrônico do Instituto lista das espécies vegetais invasoras não indicadas para restauração florestal (ESPÍRITO SANTO, acesso em 22 ago. 2015); entretanto, a mesma ainda não saiu oficialmente como dispositivo legal por divergências com o Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal – IDAF, uma vez que muitas das espécies ali contidas são de interesse econômico. Em termos de instrumentos legais, o Órgão também tenta avançar na questão; a Instrução Normativa IEMA nº 17, de 06 de dezembro de 2006, que institui Termo de Referência para elaboração de Planos de Recuperação de Áreas Degradadas – PRADs que visem à restauração de ecossistemas, estabelece em seu art. 2º que só devem ser utilizadas espécies

nativas (inciso IV, alínea c), além de preconizar a previsão do manejo das espécies invasoras (inciso III) nas ações de manutenção dos projetos de restauração (ESPÍRITO SANTO, 2006); da mesma forma, a Resolução CONSEMA nº 004/12, que institui procedimento de PRAD simplificado, norteia para que os plantios sejam exclusivamente com espécies nativas (ESPÍRITO SANTO, 2011).

Um dos grandes problemas de invasão por espécies exóticas no Estado refere-se às Unidades de Conservação - UC; atualmente, estão sob administração do IEMA dezessete Unidades Estaduais, sendo nove de Proteção Integral e oito de Uso Sustentável, abrangendo 0,8% (45.957,50 ha) do território. Segundo o SNUC, as ameaças à biodiversidade devem ser prevenidas, controladas e eliminadas dentro das UCs, visto que estas se destinam à proteção da biodiversidade (LEÃO et al., 2011; FOXCROFT, 2013). Ainda que uma UC esteja, em tese, livre de ameaças antrópicas diretas, pode ser seriamente alterada pela invasão de espécies exóticas caso não sejam implementadas ações de detecção e manejo (SAMPAIO; SCHMIDT, 2013). Segundo Leão e outros (2011, p. 15-16),

As Unidades de Conservação de proteção integral devem ser consideradas com especial atenção, pois são refúgios naturais que devem ser salvaguardados em regime de perpetuidade. A presença de espécies exóticas invasoras nessas áreas é incompatível com a conservação da biodiversidade e dos recursos naturais e devem ser objeto de erradicação ou de controle permanente. [...] Nas Unidades de Conservação de uso sustentável, as espécies exóticas devem ser manejadas em regime de contenção e controle para evitar a proliferação para fora das áreas destinadas ao cultivo. [Além disso,] é importante regulamentar o uso e a produção de espécies exóticas nas UCs de uso sustentável e nas zonas de amortecimento de UCs de proteção integral para evitar que elas sejam focos permanentes de disseminação de espécies exóticas invasoras.

Os impactos das espécies invasoras nas áreas protegidas vão além da modificação na estrutura da comunidade, interferindo – também – na ciclagem de nutrientes, hidrologia e regime de fogo (FOXCROFT, 2013); a fragmentação de habitats acaba por elevar o grau de isolamento das áreas protegidas, aumentando sua vulnerabilidade a influências externas, tais como a invasão por espécies exóticas. (ZILLER; DECHOUM, 2013). No Estado, conforme levantamento prévio realizado pelo IEMA, todas as UCs apresentam espécies exóticas invasoras em seu interior, o que representa uma séria ameaça à biodiversidade ali existente, incluindo espécies endêmicas e ameaçadas de extinção.

A Estratégia Nacional sobre Espécies Exóticas Invasoras estabelece as UC de proteção integral como áreas prioritárias para ações de identificação, avaliação de risco e impacto, bem como para o estabelecimento de medidas para prevenção, erradicação e monitoramento dessas espécies; apesar do levantamento de espécies exóticas ser uma prerrogativa dos planos de manejo das UCs de proteção integral, poucos deles o possui (SAMPAIO; SCHMIDT, 2013).

Em 2007, o IEMA realizou um levantamento das espécies invasoras de cinco UC: Parque Estadual de Itaúnas (PEI), Parque Estadual Paulo César Vinha (PEPCV), Parque Estadual de Forno Grande (PEFG), Parque Estadual de Pedra Azul (PEPAZ) e Reserva Biológica de Duas Bocas (REBioDB). O resultado foi a elaboração de um plano de ação para a erradicação das espécies-problema, que culminou com a publicação da Instrução Normativa IEMA nº 03 (não mais em vigor), a fim de normatizar o processo de eliminação e controle de espécies vegetais exóticas invasoras em Unidades de Conservação estaduais, prevendo prazo de 18 meses para elaboração de projetos executivos para sua erradicação. Todavia, só foram realizadas ações emergenciais no PEPCV e PEI, porém, sem continuidade para garantir sua eficácia.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES INVASORAS DETECTADAS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NO ESPÍRITO SANTO

De um modo geral, as espécies exóticas com maior grau de invasão nas UCs estaduais são *Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam, *Eriobothrya japônica* (Thunb.) Lindl., *Leucaena leucocephala* (Lam.) R. de Wit. e *Urochloa brizantha* Hochst. ex A. Rich. R.D. Webster<sup>32</sup>.

### 2.5.1. *Acacia mangium* Willd

Originária da Austrália, Papua Nova Guiné, Indonésia e Ilhas Molucas, a acácia é uma árvore perene, disseminada para diversas regiões como fonte de lenha,

---

<sup>32</sup> Recentemente, grande parte das espécies pertencentes ao gênero *Brachiaria* foram reclassificadas como *Urochloa*, devido a trabalhos de revisão taxonômica de autores argentinos, colombianos e australianos; todavia, ainda há inúmeras controvérsias no meio científico acerca dessa reclassificação. No Brasil, a existência de um arcabouço legal que consagram o uso do gênero *Brachiaria* (como a Lei de proteção de cultivares, dentre outras) é um empecilho para a aceitação dessa reclassificação, permanecendo – portanto – a utilização do termo *Brachiaria*. (VALLE, 2010).

madeira para construção e fabricação de móveis e, principalmente para recuperação de áreas degradadas e controle de erosão (MATTHEWS, 2005).

A Austrália começou a fazer parte do circuito global de intercâmbio de plantas no final do século XVIII e as acácias e eucaliptos se tornaram as espécies de maior destaque devido à sua grande capacidade de adaptação em regiões de clima tropical. Atualmente, junto aos eucaliptos e pinheiros, representam uma grande porção dos gêneros de árvores plantados fora de sua distribuição natural (ATTIAS; SIQUEIRA; BERGALLO, 2013), com aproximadamente 600 mil hectares de área comercialmente explorada (IPEF, acesso em 23 abr. 2013), principalmente no Sudeste Asiático (KRISNAWATI; KALLIO; KANNINEN, 2011).

Introduzida no Brasil há pouco mais de 100 anos para reflorestamento em áreas degradadas por se desenvolver bem em solos pobres e ácidos, se espalhou rapidamente, principalmente no Espírito Santo, estando presente em quase todas as Unidades de Conservação estaduais (ELESBON et al., 2015).

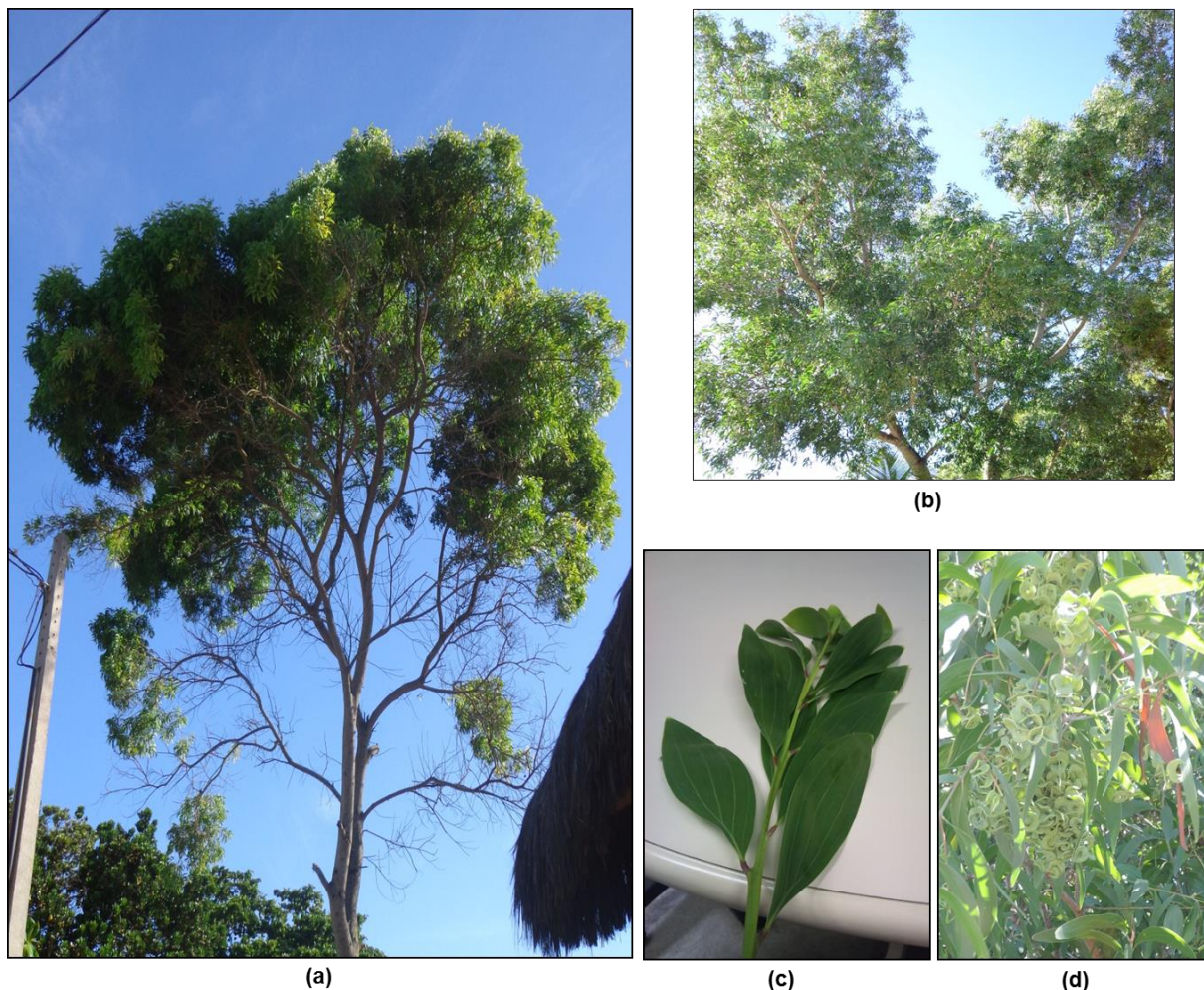
No concernente à ocupação de áreas nativas, um estudo realizado por Correia e Martins (2015) registrou a presença de indivíduos jovens de *A. mangium* em fragmento de floresta nativa após abertura de clareira, reafirmando seu caráter oportunista e sua capacidade de inibir a regeneração de espécies nativas após perturbações locais.

#### 2.5.1.1. Características botânicas

Pertencente à família Fabaceae, é uma leguminosa perenifólia, cuja copa densa pode chegar até 30 m de altura. As folhas são simples e alternas, em ramos verdes e alados, dispostos espiraladamente, ovalado-lanceoladas ou ovalado-longadas, largas, coriáceas, de pecíolo curto, ápice alongado, com nervuras salientes partindo da base, de 12-18cm de comprimento; suas flores pentâmeras encontram-se dispostas em espigas soltas de 10 cm de comprimento, solitárias ou unidas nas axilas superiores. Os frutos são do tipo vagem, espiralados, marrons e deiscentes, cujas pequenas sementes pretas estão pendentes por um arilo alaranjado e se dispersam pelo vento e por pássaros (ATTIAS; SIQUEIRA; BERGALLO, 2013); sua dormência tegumentar permite que se mantenham viáveis por longos períodos no

solo (KRISNAWATI; KALLIO; KANNINEN, 2011). A figura 4 apresenta fotos da espécie.

**Figura 4** – *A. mangium* Willd, onde: **(a-b)** – Indivíduo adulto; **(c)** – folhas; e **(d)** – galho com sementes.



Fonte: Acervo do autor.

#### 2.5.1.2. Aspectos ecológicos

Como toda espécie invasora, *A. mangium* apresenta rápido crescimento, baixo requerimento nutricional, tolerância a acidez do solo (pH entre 4,5 a 6,5) e elevada taxa de fixação de nitrogênio devido à simbiose com bactérias diazotróficas (IPEF, acesso em 23 abr. 2013). Causa acidificação do solo graças ao acúmulo de serapilheira (ATTIAS; SIQUEIRA; BERGALLO, 2013).

Oferece risco para o equilíbrio hídrico, especialmente em caso de invasão em ambientes ciliares, por fazer alto consumo de água (I3N, acesso em 16 dez. 2015).



Quanto aos efeitos alelopáticos, pode influenciar negativamente a germinação e desenvolvimento de outras plantas e, até mesmo, de sua própria espécie (figura 5).

**Figura 5** – Indivíduo de *A. mangium* no Parque Estadual de Itaúnas – PEI, inibindo alelopaticamente o desenvolvimento de espécie nativa, onde **(a)** – acácia; **(b)** – nativa secando.



Fonte: Acervo da Comissão de Recuperação de Ecossistemas – IEMA.

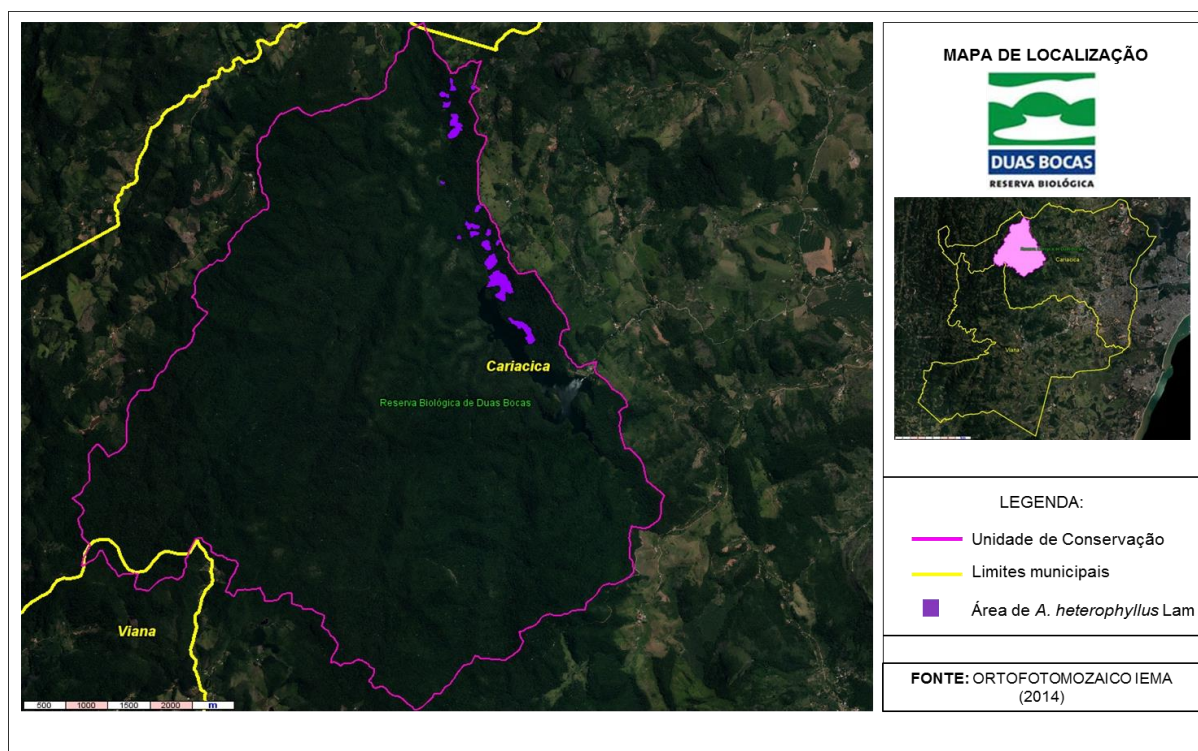
### 2.5.2. *Artocarpus heterophyllus* Lam

Originária da Índia e Malásia, a jaqueira apresenta elevada capacidade de substituir a vegetação nativa e modificar a relação fauna-flora, visto que seus frutos se tornam fonte de alimento para a fauna local (THE NATURE CONSERVANCY, 2009).

Foi uma das primeiras espécies exóticas a serem introduzidas na Mata Atlântica, mais precisamente no início do século XIX (ZENNI; ZILLER, 2011). É utilizada agronomicamente como fonte de alimento e, também, como ornamental; pela sua ação anti-hipoglicêmica, antioxidante e bactericida, bem como seus efeitos no metabolismo ligado à produção de melanina, a espécie está sendo investigada quanto ao potencial medicinal (PERDOMO; MAGALHÃES, 2007; BALIGA et al., 2011).

Conforme dados da I3N (acesso em 16 dez. 2015), o ambiente preferencial de invasão da espécie é o de floresta tropical, onde formam monoculturas, com pouquíssimas plântulas de espécies nativas dividindo o habitat, o que sugere algum tipo de efeito alelopático (PERDOMO; MAGALHÃES, 2007). Ademais, nas áreas invadidas formam um denso e aglomerado banco de plântulas e de sementes, inibindo a germinação e desenvolvimento de nativas (LUCENA, 2009) e dificultando sobremaneira ações de manejo e controle. No Espírito Santo, domina vinte hectares na Reserva Biológica de Duas Bocas (figura 6).

**Figura 6** – Área de invasão de *A. heterophyllus* Lam na Reserva Biológica de Duas Bocas, Cariacica - ES.



Fonte: ESPÍRITO SANTO, 2014.

#### 2.5.2.1. Características botânicas

*A. heterophyllus* (figura 7) é uma árvore monoica perenifólia, lactescente, com 12-20 m de altura, cujo tronco robusto é revestido por casca espessa. Pertencente à família Moraceae, apresenta folhas simples, alternas, com 15 a 25 cm de comprimento e 10 a 12 cm de largura. As flores masculinas encontram-se agrupadas em espigas claviformes, enquanto as femininas estão dispostas em espigas compactas; seus frutos sincarpas de forma ovalada são amarelos e grandes, com



inúmeras sementes que são dispersas por animais (I3N, acesso em 16 dez. 2015; BALIGA et al., 2011).

**Figura 7** - *A. heterophyllus* Lam, onde: **(a)** – Indivíduo adulto; **(b)** – folhas; **(c)** – fruto imaturo; e **(d)** – fruto maduro.



Fonte: Acervo do autor.

#### 2.5.2.2. Aspectos ecológicos

Adaptam-se imensamente rápido em regiões onde há bastante precipitação (BALIGA et al, 2011).

Apresentam ação alelopática que impede a germinação e o desenvolvimento de espécies nativas (THE NATURE CONSERVANCY, 2009).

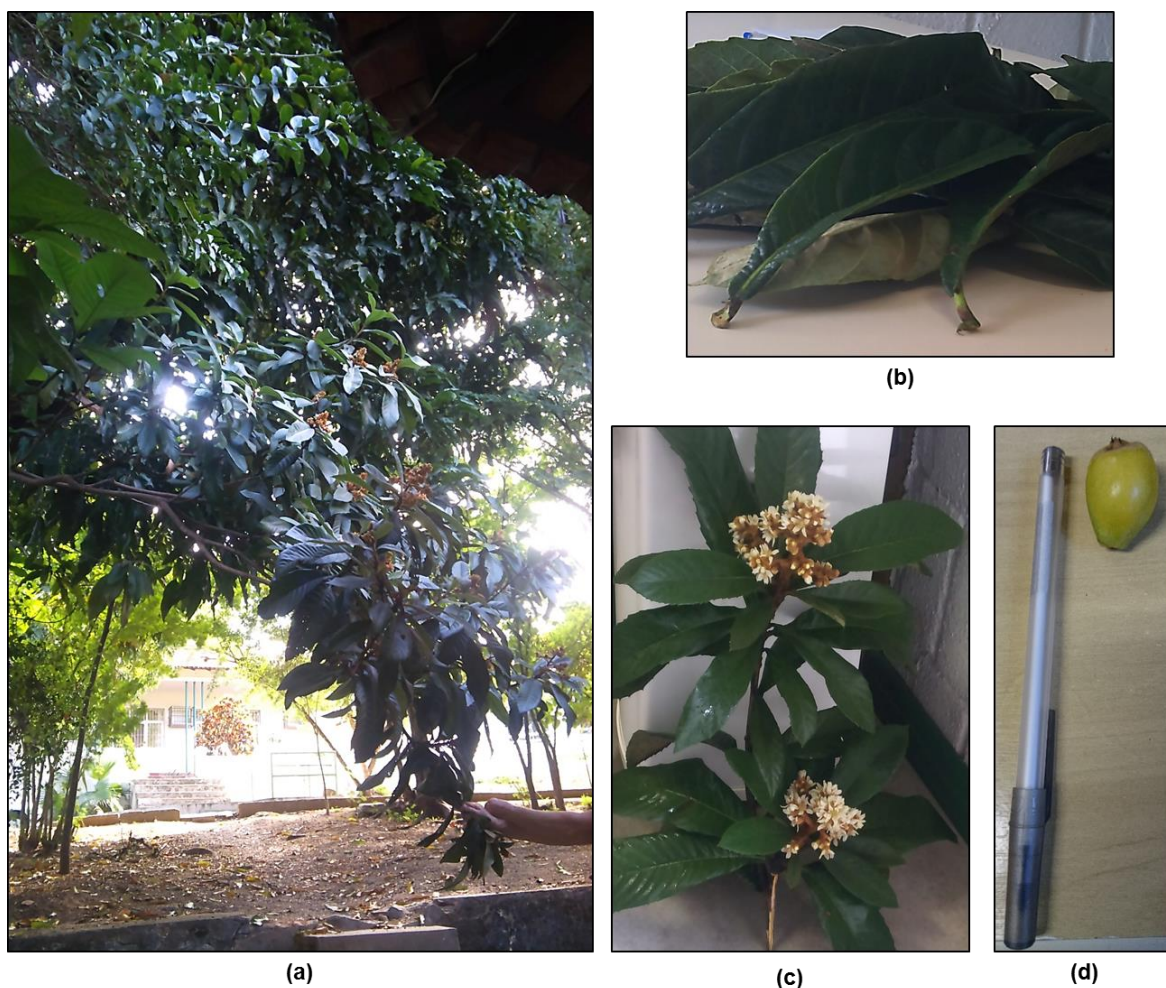
### 2.5.3. *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl.

Conhecida popularmente como ameixeira ou nêspira, é originária do sudeste da China, mas foi largamente difundida em diversos países como fonte alimentar. No Estado, é um problema no Parque Estadual de Pedra Azul.

#### 2.5.3.1. Características botânicas

Membro da família Rosaceae, pode atingir até 10 m de altura. Possui Folhas alternas, coriáceas, obovadas, com 15-25 cm de comprimento e 3-5 cm de largura, agudas nas duas extremidades; inflorescência piramidal e terminal, com flores hermafroditas, actinomorfas, pentâmeras, branco-marfim e perfumadas. Frutos globosos ou elipsoides, amarelos, carnosos e doces, cuja semente é dispersa por aves e mamíferos (figura 8) (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

**Figura 8** – *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl, onde: **(a)** – Indivíduo adulto; **(b)** – folhas; **(c)** – ramo com flores; e **(d)** – fruto maduro.



Fonte: Acervo do autor.

#### 2.5.3.2. Aspectos ecológicos

Invade florestas úmidas, podendo dominar tanto o sub-bosque quanto o estrato superior. Adapta-se a diferentes tipos de solo, mesmo com pH ligeiramente ácido e é altamente resistente ao frio, à seca e a diferentes intensidades luminosas (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

Sua fitoquímica não é bem explorada, tendo sido realizados poucos estudos com foco apenas em terpenos e polifenóis (ITO et al., 2000).

#### **2.5.4. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit**

Natural da América Central e México, essa espécie da família Fabaceae, popularmente conhecida como leucena, tem seu cultivo apoiado por diversas organizações agroflorestais internacionais devido ao seu crescimento rápido e por ser forrageira, fixadora de nitrogênio e tolerante a seca (THE NATURE CONSERVANCY, 2009). Atualmente, ocorre na maior parte das áreas tropicais e sub-tropicais do planeta, constituindo uma fonte de alimentação nutritiva para animais de criação (MATTHEWS, 2005); está presente em todas as UCs do Estado.

Devido ao seu elevado potencial de invasão, a leucena está na lista das 100 espécies invasoras mais danosas do mundo (LOWE et al., 2004); tende a invadir margens de florestas, beira de estradas, áreas degradadas, margens de rios e, até mesmo, terras cultivadas, formando densos aglomerados monoespecíficos de difícil erradicação, haja vista a facilidade de rebrota (THE NATURE CONSERVANCY, 2009).

Além de substituir as espécies nativas, expõe o solo à erosão e pode impactar a fauna não ruminante que se alimente de suas folhas e sementes, devido aos altos teores do aminoácido mimosina (MATTHEWS, 2005; THE NATURE CONSERVANCY, 2009). Conforme dados do ICMBio (BRASIL, acesso em 22 dez. 2015), está presente em toda a ilha de Fernando de Noronha, ameaçando a diversidade local.

##### 2.5.4.1. Características botânicas

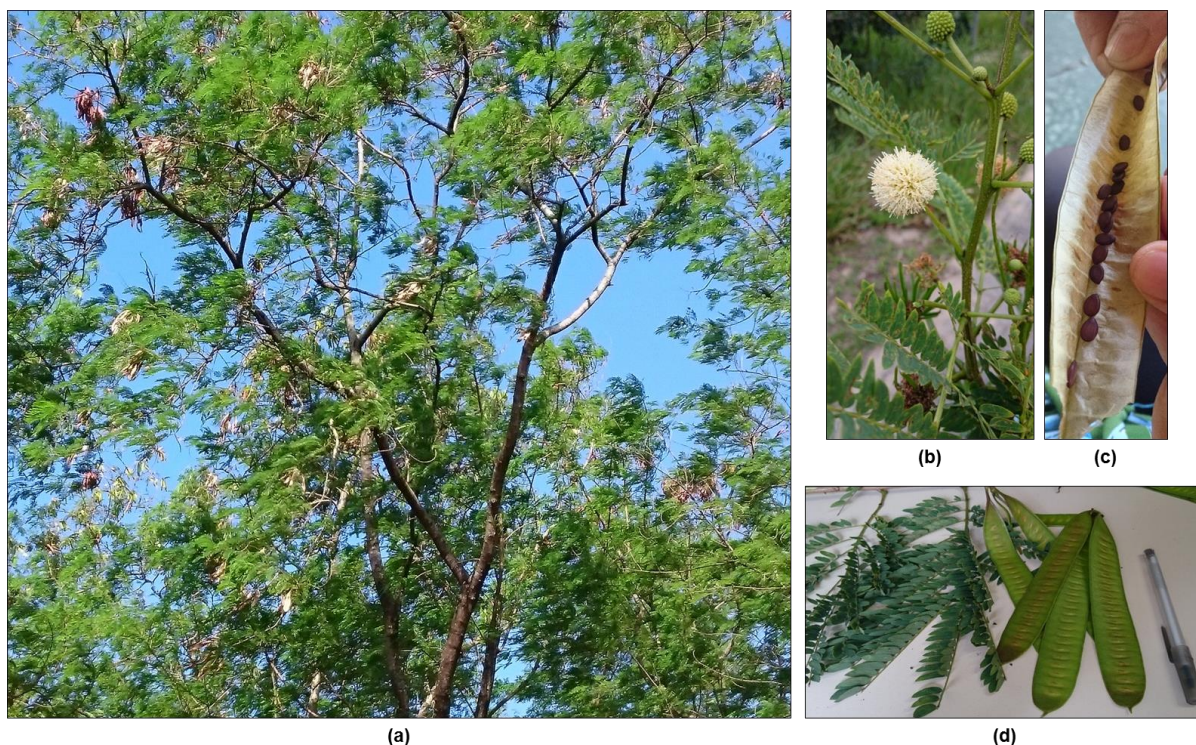
Árvore de pequeno porte, atingindo entre 5 e 10 m de altura (figura 9), cujas folhas são alternas bipinadas, com 4-9 pares de pinas, cada uma com 11-17 pares de



folíolos opostos, lanceolados e acuminados. A inflorescência é globosa, com flores com corola e estames brancos, cálice com 2,5 mm, pétalas lineares, estames em número de 10 e anteras pilosas; os frutos são vagens marrom-escuras agrupadas, lineares e achatadas, contendo cerca de 20 sementes de coloração marrom brilhante, oblongas-ovais e achatadas, liberadas por auto-dispersão ou por animais (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

O sistema radicular é profundo, com poucas raízes laterais, que ocorrem próximas à superfície do solo (OLIVEIRA, 2008).

**Figura 9** - *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, onde: **(a)** – Indivíduo adulto; **(b)** – ramo com flores; **(c)** – fruto com sementes; e **(d)** – ramo com folhas e frutos.



Fonte: Acervo do autor.

#### 2.5.4.2. Aspectos ecológicos

Reproduz-se principalmente por auto-fecundação, de forma que até mesmo indivíduos isolados produzem sementes, aumentando seu potencial de ocupação do habitat. Floresce e frutifica continuamente ao longo do ano, podendo produzir até 2000 sementes, cuja durabilidade no solo pode chegar a 20 anos (HOROWITZ; MARTINS; WALTER, 2013).

Ocupa ambientes abertos, principalmente em zonas ripárias ou costeiras com clima tropical seco (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

Por ser uma leguminosa, ao fixar nitrogênio por simbiose, transforma as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, o que lhe confere o rótulo de invasora agressiva (HOROWITZ; MARTINS; WALTER, 2013); seus efeitos alelopáticos, podem limitar o processo de sucessão inibindo a germinação de espécies nativas e dificultando a ocorrência de regeneração natural em áreas degradadas (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

#### **2.5.5. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster**

Da família Poaceae, é natural das savanas africanas. Popularmente chamada de braquiário, foi introduzida no Brasil e em outras partes do mundo como forragem para gado, tornando-se uma das espécies de gramíneas mais invasoras.

O alto potencial de invasão permite que a espécie se evada das áreas de pastagem e ocupem ambientes naturais; o emprego na revegetação de taludes potencializa sua dispersão (LEÃO et al., 2011).

Segundo Sampaio e Schmidt (2013), as espécies exóticas invasoras de gramíneas africanas alteram o ambiente de forma a dificultar o estabelecimento de espécies nativas e facilitar sua própria expansão, tornando-as a pior ameaça à efetividade de conservação de UCs.

##### **2.5.5.1. Características botânicas**

Monocotiledônea herbácea (figura 10), atingindo até 1,5 m de altura, sendo a espécie de maior porte entre as braquiárias cultivadas como forrageiras no Brasil. Possui colmos cilíndricos, estriados e glabros; folhas em forma de bainhas fechadas, densamente pilosas, lâminas planas, linear-lanceoladas, de margens curtamente serrilhadas. As inflorescências são formadas por 1-16 racemos distanciados irregularmente entre si. Raque com cerca de 1 mm de largura, verde ou violácea, em geral muito ciliada nas margens. Espiguetas ocorrendo num lado da raque, normalmente com alinhamento simples na parte terminal, orientando-se alternadamente para um e outro lado. Sementes pequenas, dispersas pelo vento e

por animais. O sistema basal é formado por rizomas curtos, com menos de 5 cm, retos ou recurvados, recobertos por escamas (catáfilos) amarelas e brilhantes. As raízes são fasciculadas (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

**Figura 10** - *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, onde: **(a)** – folhas; **(b)** – inflorescência; **(c)** – sementes.



Fonte: (a-b) - HERNANDEZ, acesso em 17 jan. 2016; (c) – acervo do autor.

#### 2.5.5.2. Aspectos ecológicos

Invade áreas de lavouras anuais e perenes, beira de estradas e terrenos baldios, campos e savanas; desenvolve-se bem em regiões com um mínimo de 800 mm de chuvas anuais, sendo bem tolerante ao frio e geadas (I3N, acesso em 16 dez. 2015).

Exerce dominância sobre ambiente natural por alelopatia, formando touceiras densas e expulsando espécies nativas (RODRIGUES et al., 2012), podendo alterar os ciclos de nutrientes devido à alta demanda por esses elementos durante seu crescimento, bem como o regime de fogo e luminosidade na superfície do solo pela grande produção de biomassa (MATOS; PIVELLO, 2009).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a análise fitoquímica e avaliar a ação alelopática dos extratos etanólicos foliares de três espécies invasoras presentes em Unidades de Conservação Estaduais (*Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam e *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd;
- Inferir os possíveis efeitos alelopáticos exercidos por extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Allium cepa* e *Lactuca sativa*;
- Analisar se os extratos etanólicos foliares de *A. heterophyllus* Lam, *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd possuem efeito alelopático sobre a germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies invasoras - *Urochloa brizantha* e *Leucaena leucocephala* – podendo servir como base para o desenvolvimento de um produto que atue como controle biológico para estas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

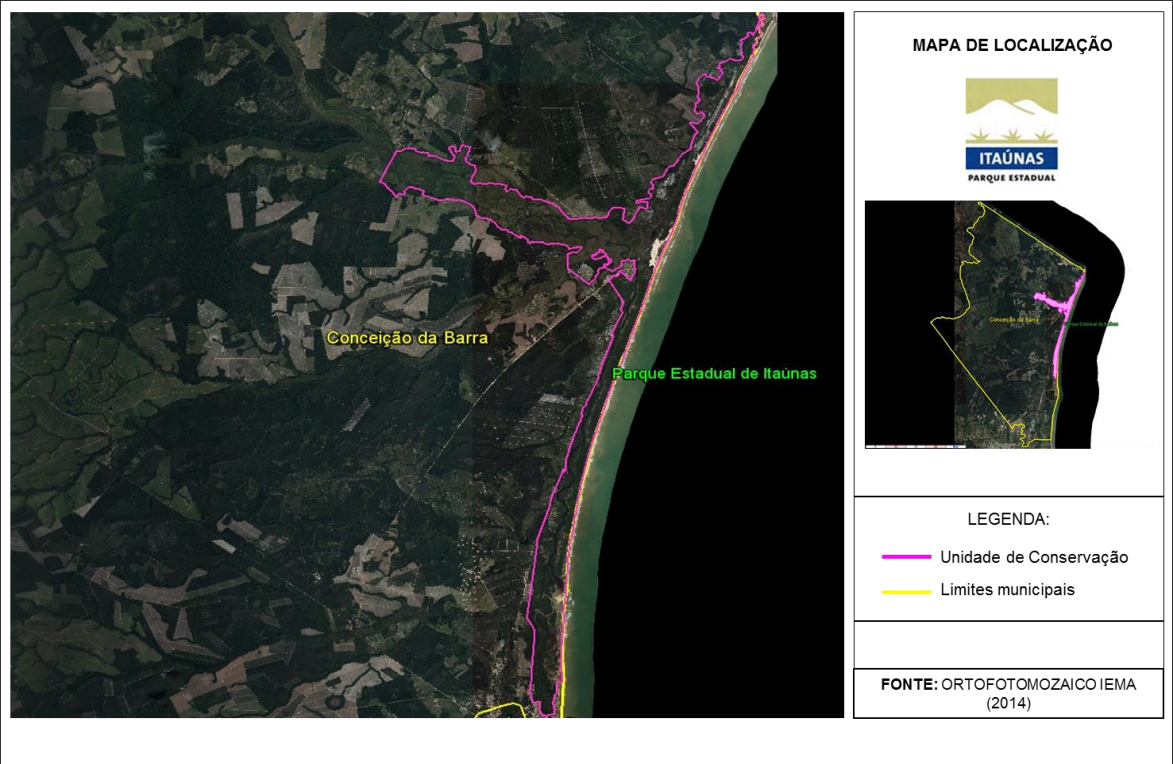
O preparo dos extratos bem como a realização dos experimentos alelopáticos foram conduzidos nas dependências do laboratório de Genética de Plantas e Toxicológica, enquanto a prospecção fitoquímica foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais, ambos localizados na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

### 4.1 ÁREAS DE COLETA DAS ESPÉCIES VEGETAIS

Para o preparo dos extratos testados neste estudo foram utilizadas folhas de três espécies vegetais invasoras:

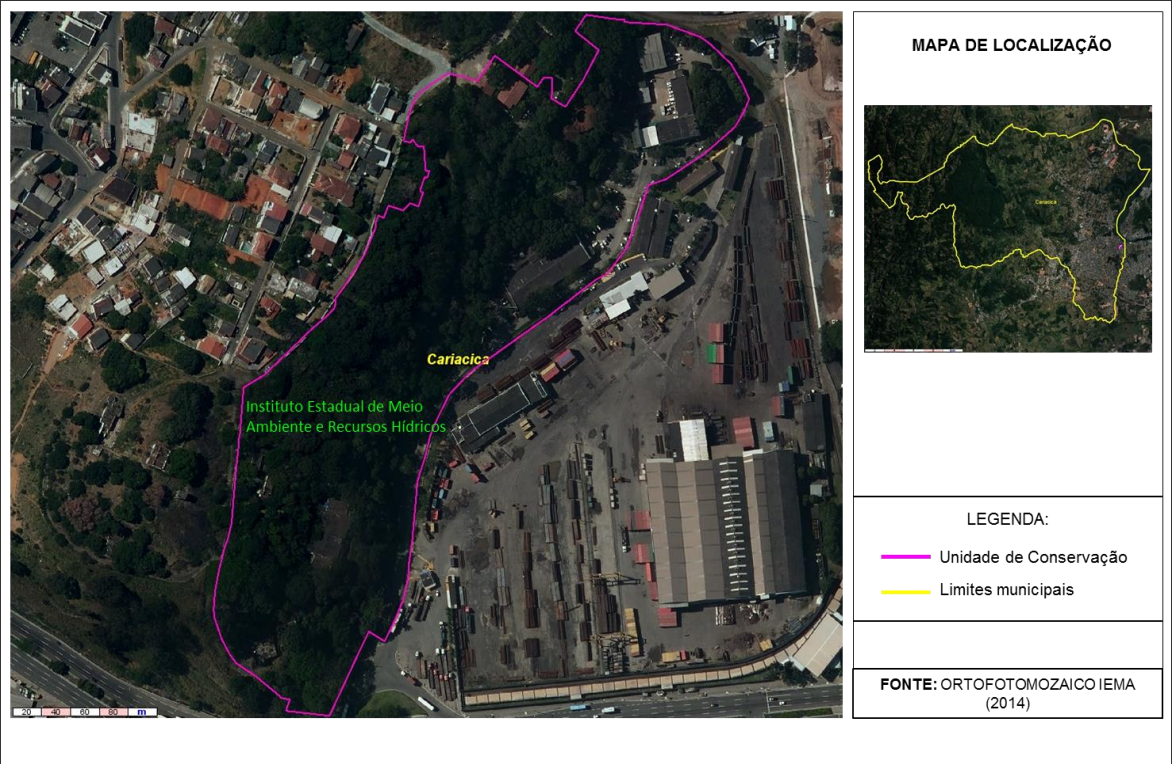
- *Acacia mangium* Willd foi coletada no Parque Estadual de Itaúnas – coordenadas 24K/UTM 425435/7963509 Datum WGS84 (figura 11), enquanto *Artocarpus heterophyllus* Lam foi coletada na sede do IEMA – coordenadas 24K/UTM 358035/7751317 Datum WGS84 (figura 12), ambas em março de 2014. Um exemplar testemunha de cada espécie foi depositado no Herbário Central VIES/UFES, cujo números de tombo são 38066 e 38068, respectivamente.

**Figura 11** - Parque Estadual de Itaúnas, Conceição da Barra – ES, área de coleta de *A. mangium* Willd.



Fonte: ESPÍRITO SANTO, 2014.

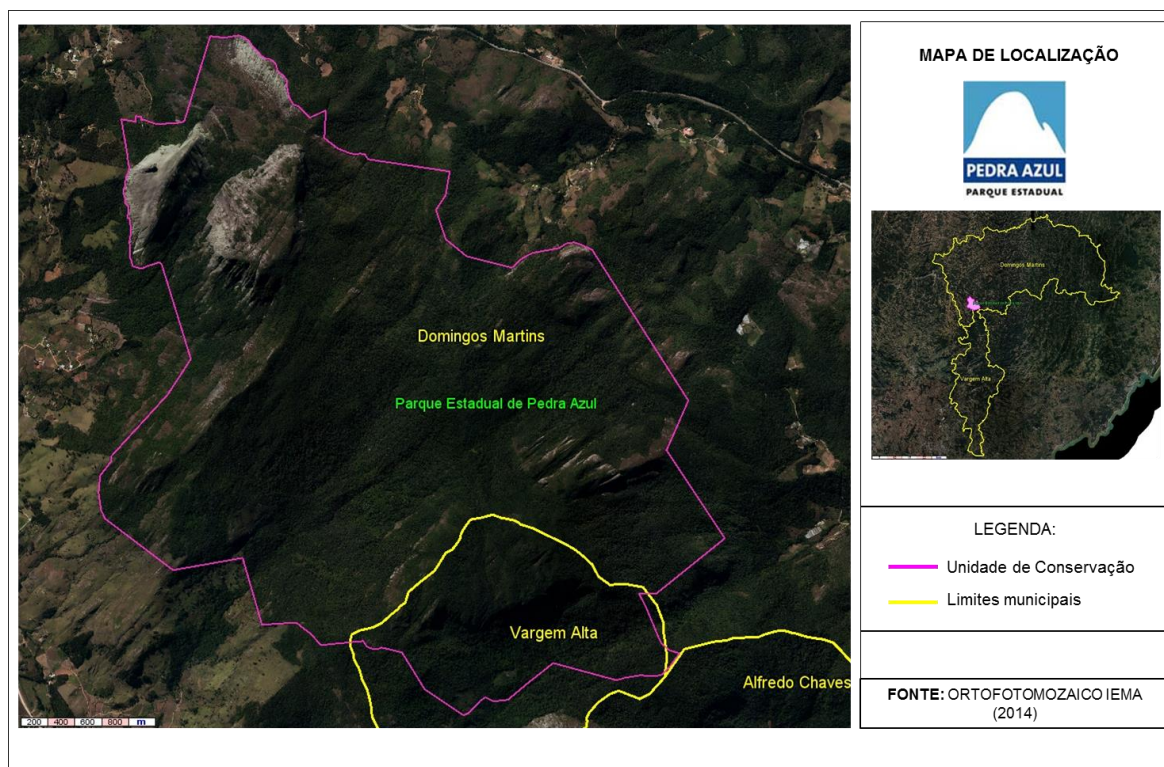
**Figura 12** – Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), Cariacica – ES, área de coleta de *Artocarpus heterophyllus* Lam.



Fonte: ESPÍRITO SANTO, 2014.

- *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl foi coletada em abril de 2014, no Parque Estadual de Pedra Azul (figura 13), coordenadas 24K/UTM 288774/7742988 Datum WGS84. Um exemplar foi depositado no Herbário Central VIES/UFES, sob o número 38067.

**Figura 13** – Parque Estadual de Pedra Azul, Domingos Martins/Vargem Alta – ES, área de coleta de *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl.



Fonte: ESPÍRITO SANTO, 2014

As folhas das espécies acima foram coletadas com o auxílio de podão e secas separadamente à temperatura ambiente; após, foram reduzidas a pedaços menores manualmente e, em seguida, trituradas em liquidificador industrial de baixa rotação Vitalex – modelo L.QI-04 (figura 14).



**Figura 14** – Secagem e trituração das folhas das espécies invasoras testadas, onde: **(a)** – folhas submetidas à secagem em temperatura ambiente; **(b)** – folhas já secas, partidas manualmente em pedaços menores; **(c)** – processo de trituração; e **(d)** – folhas trituradas.



Fonte: Acervo do autor.

## 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para a obtenção dos extratos etanólicos, dois quilos do material vegetal triturado foram adicionados a cinco litros de álcool etílico 99,3° (INPM) e submetidos à maceração por exaustão durante cinco dias. De forma a proteger o material da luminosidade para evitar uma possível fotólise, o recipiente foi envolto em papel alumínio e acondicionado em um saco plástico preto. O procedimento acima foi repetido para cada espécie analisada.

Após o período de maceração, o material foi filtrado e o sobrenadante submetido à rotaevaporação em Evaporador Rotativo Tecnal – modelo TE 210 e posterior

secagem em estufa para a completa extração do etanol. A figura 15 mostra as principais etapas do procedimento descrito.

**Figura 15** – Preparo do extrato etanólico, onde: **(a)** – material vegetal (folhas) triturado umedecido com álcool; **(b)** – recipiente sendo protegido da luminosidade; **(c)** – material sendo filtrado após período de maceração por exaustão; **(d)** – rotaevaporação do material resultante da filtração; e **(e)** – extrato vegetal pronto.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Fonte: Acervo do autor.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA E DO pH DOS EXTRATOS

Devido ao fato de o extrato bruto apresentar certo grau de hidratação mesmo após ter sido evaporado, realizou-se a determinação da massa seca para mensurar a quantidade efetiva de extrato (não hidratado) a ser utilizada nos protocolos experimentais. Para isto, inicialmente uma cápsula de porcelana vazia foi aquecida e pesada em balança digital Celtec – modelo FA2104N, a fim de tará-la. Em seguida, a cápsula contendo 500 mg do extrato bruto foi então colocada para aquecimento novamente até a total evaporação do solvente, controlando cuidadosamente o aquecimento para evitar a perda do material devido à fervura. A seguir, a cápsula foi pesada. O procedimento foi repetido até se obter a mesma massa três vezes seguidas. As concentrações de extratos utilizadas neste estudo foram baseadas na massa seca dos mesmos.

Para a determinação do pH das concentrações testadas dos extratos vegetais utilizados neste trabalho foi utilizado um phmetro portátil KASVI – modelo K39-0014P.

### 4.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A partir dos extratos etanólicos das folhas de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl, foram realizadas reações seletivas para detecção qualitativa dos principais grupos constituintes dos metabólitos secundários, conforme descrição a seguir (COSTA, 1982):

#### 4.4.1 Flavonoides

Os extratos vegetais foram diluídos em etanol e submetidos às seguintes reações:

##### 4.4.1.1 Reação de Cianidina

Uma alíquota (1mL) do extrato diluído foi colocado em um tubo de ensaio, onde se acrescentaram 1 mL de Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e fragmentos de zinco. Avaliou-se a mudança de coloração.

#### 4.4.1.2 Reação com Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ )

Uma alíquota do extrato diluído foi colocada em uma cápsula; em seguida foi acrescentado 0,5mL de  $\text{AlCl}_3$  a 2%, aquecendo a mistura até completa secagem. Avaliou-se o surgimento de fluorescência amarelo-esverdeada sob luz UV.

#### 4.4.2 Triterpenos e Esteroides

Os extratos etanólicos foram diluídos em etanol e submetidos às reações de Liebermann-Burchard e Salkowski para a identificação de triterpenos e esteroides, respectivamente.

##### 4.4.2.1 Reação de Liebermann-Burchard

Adicionou-se à alíquota do extrato diluído 1mL de anidrido acético e algumas gotas de Ácido Sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Avaliou-se o surgimento de coloração castanho-avermelhada como sinalização positiva para a presença de triterpenos.

##### 4.4.2.2 Reação de Salkowski

Foram adicionadas 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 1 mL de solução clorofórmica filtrada do extrato. Avaliou-se o desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada, indicadora da presença de esteroides.

#### 4.4.3 Cumarina

Aplicou-se uma gota do extrato diluído em etanol em uma tira de papel filtro e adicionou-se uma gota de Hidróxido de Potássio (KOH) a 10%; após secagem, a mancha foi visualizada sob luz U.V. Avaliou-se a presença de fluorescência azul ou amarela.

#### 4.4.4 Saponina Espumídica

À alíquota do extrato diluído em etanol foram adicionadas água destilada e gotas de solução de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) até atingir pH neutro. Após, a mistura foi aquecida até a ebulição e, em seguida, resfriada. Completou-se o volume para 100 mL com água destilada e agitou-se o tubo energicamente por 60 segundos. Após



repouso, avaliou-se o surgimento de camada de espuma persistente acima de 1cm de altura.

#### **4.4.5 Alcaloides**

Adicionou-se 1,5mL de Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e gotas do reagente de Draggendorf à alíquota do extrato diluído em etanol. Após repouso, analisou-se a formação de precipitado de coloração alaranjada.

#### **4.4.6 Taninos**

Adicionaram-se à alíquota do extrato diluído em etanol 2 gotas de Ácido Clorídrico (HCl) a 10% e 2 gotas de sal de alcaloide (cafeína). Avaliou-se a formação de precipitado de coloração branca.

#### **4.4.7 Glicosídeos Antraquinônicos**

Para a detecção de antraquinona foi realizada a reação de Bornträger, onde 2 mL de solução de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 10% (v/v) foram adicionados a 3 mL do extrato etanólico diluído em clorofórmio. Posteriormente, o tubo de ensaio foi agitado vigorosamente promovendo a separação em duas fases distintas (aquosa e orgânica). O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada na fase aquosa é indicativa da presença de antraquinona na amostra.

### **4.5 TESTE DE QUEBRA DE DORMÊNCIA**

Algumas sementes necessitam superar o estado de dormência para conseguirem germinar; sendo este o caso das espécies *L. leucocephala* e *U. brizantha*, foram realizados testes preliminares ao ensaio alelopático, visando determinar o método de quebra de dormência menos invasivo, de modo a não influenciar os resultados do teste de alelopatia, e que gerasse as melhores taxas de germinação.

Para isso, seguindo sugestões da literatura, sementes de *L. leucocephala* foram submetidas aos seguintes tratamentos, além da germinação direta em água à temperatura ambiente: exposição a pleno sol e imersão em água a 80°C por dez minutos.

Por sua vez, as sementes de *U. brizantha* receberam, além da germinação direta em água à temperatura ambiente, cinco tratamentos distintos: escarificação em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado por dez minutos e posterior lavagem em água corrente para a retirada completa do ácido; imersão em água a 80°C por dez minutos; imersão em água a 100°C por dois minutos; imersão em sumo de limão por dez minutos; e imersão em sumo de laranja por dez minutos.

Os testes foram realizados em triplicatas, totalizando 90 sementes dispostas aleatoriamente em placas de Petri (30 sementes/placa) forradas com uma folha de papel filtro umedecido com 5mL de água deionizada. A cada vinte e quatro horas por dez dias foi mensurado o número de sementes germinadas, ou seja, que apresentaram protusão radicular com cerca de 2 mm, conforme recomendado pelas Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

Para a medição da temperatura da água, quando necessário, utilizou-se um termômetro digital industrial – modelo WT1, com amplitude de medição entre -50°C e +300°C.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS

O potencial alelopático dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl foram avaliados em quatro sistemas-teste: *Lactuca sativa* (alface - cultivar Americana, lote nº. 034269), *Allium cepa* (cebola - cultivar Baia Periforme, lote nº. 25870), *Leucaena leucocephala* (leucena – cultivar Cunningham, lote nº 01/2012) e *Urochloa brizantha* (braquiário – cultivar Marandú, lote nº 02/2014).

Todas as sementes foram obtidas de uma fonte comercial e selecionadas pelo mesmo lote, sendo - entretanto - não-clonais.

A água deionizada utilizada para o preparo das concentrações dos extratos e embebição das sementes submetidas ao controle negativo (CN) também foi obtida de fonte comercial, cujo nº de lote era 72794.

Além do CN, foram utilizadas as concentrações de 1, 5, 10 e 50mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl para a germinação das sementes de *L. sativa*, *A. cepa*, *L. leucocephala* e *U. brizantha*;

estas foram acondicionadas em placas de Petri recobertas com uma folha de papel filtro e embebidas em 5mL de água deionizada ou dos extratos, conforme o tratamento.

Os tratamentos foram realizados em triplicata, com cada unidade amostral contendo 30 sementes dispostas aleatoriamente, totalizando 90 sementes por tratamento.

A cada vinte e quatro horas, contados a partir da semeadura até a estabilização da germinação (quatro dias para *L. sativa* e *A. cepa* e dez dias para *L. leucocephala* e *U. brizantha*), foram mensurados o número de sementes germinadas e o comprimento das radículas. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram protusão radicular com cerca de 2 mm, conforme recomendação da RAS (BRASIL, 2009).

Para análise dos efeitos alelopáticos, foram avaliados os seguintes dados (SANTANA; RANAL, 2004; RANAL et al., 2009; FERREIRA; BORGHETTI, 2004):

- Índice de germinação (IG) - relação entre o número de sementes submetidas à germinação em tratamento contínuo e o número de sementes que efetivamente apresentaram extensão da radícula. Expresso em %.
- Índice de alelopatia (IA) – Expresso em %, é dado pela seguinte fórmula (BALSALOBRE et al., 2006).

$$IA = ((Gc - Gt) * 100) / Gc$$

Onde: Gc = germinação do controle

Gt = germinação do tratamento.

- Índice de velocidade de germinação (IVG) – dado pela seguinte fórmula:

$$IVG = \sum (ni/ti)$$

Onde: ni = nº de sementes que germinaram no tempo i

ti = tempo após instalação do teste

i = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

- Tempo médio de germinação (TMG) – expresso em dias:

$$\text{TMG} = (\sum n_i \cdot t_i) / \sum n_i$$

Onde:  $n_i$  = nº de sementes que germinaram no tempo  $i$

$t_i$  = tempo após instalação do teste

$i$  = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

- Velocidade média de germinação (VMG) – expresso em dias<sup>-1</sup>:

$$\text{VMG} = 1/t$$

Onde:  $t$  = tempo médio de germinação

- Crescimento radicular médio (CRM) – expresso em cm:

$$\text{CRM} = (\sum C_{mi})/t$$

Onde:  $C_{mi}$  = comprimento médio no dia  $i$

$t$  = tempo total do experimento

$i$  = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

- Índice de velocidade de crescimento radicular (IVCR)

$$\text{IVCR} = \sum (c_i/t_i)$$

Onde:  $c_i$  = tamanho médio das radículas no tempo  $i$

$t_i$  = tempo após a instalação do teste

$i$  = 1-4 dias ou 1-10 dias, dependendo do organismo-teste.

#### 4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram feitos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se dados não-paramétricos e amostragem probabilística, com cinco tratamentos para cada sistema-teste, feitos em triplicatas. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio da ANOVA, com pós-teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA SECA E DO pH DOS EXTRATOS

As massas secas estabelecidas para os extratos etanólicos foram: 18,80 mg (3,76%) para o extrato de *A. mangium* Willd, 37,2 mg (7,44%) para o extrato de *A. heterophyllum* Lam e 28,64 mg (5,73%) para o extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl.

Na tabela 1 estão descritos os valores de pH encontrados para as concentrações testadas dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.

**Tabela 1.** Valores de pH para as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.

EXTRATO	CONCENTRAÇÃO (mg/ml)	pH
CN (H <sub>2</sub> O deionizada)	-	6,03
<i>A. mangium</i> Willd	1	5,31
	5	4,70
	10	4,80
	50	4,96
<i>A. heterophyllum</i> Lam	1	4,84
	5	4,48
	10	4,39
	50	4,23
<i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl	1	4,86
	5	4,50
	10	4,30
	50	4,13

A verificação do pH é importante, uma vez que solutos como açúcares e ácidos orgânicos presentes nos extratos podem mascarar o efeito alelopático ou causar resultados falso positivos.

O pH da água está dentro dos parâmetros recomendados pela RAS, que preconizam uma faixa entre 6,0 e 7,5 para testes de germinação (BRASIL, 2009). Quanto aos extratos, os valores obtidos ficaram entre 4,13 e 5,31, considerados

ideais para a promoção da germinação, uma vez que, conforme Silveira, Maia e Coelho (2012), pH abaixo de 4,0 e superior a 10 afetam negativamente o processo de emissão radicular e, até mesmo, o desenvolvimento da plântula.

Observa-se que, conforme a concentração do extrato se eleva, ocorre uma queda nos valores de pH, o que pode ser explicado pelo acúmulo dos metabólitos secundários nas maiores concentrações; contudo, essa redução não chegou a valores que interfeririam negativamente no desenvolvimento dos organismos-teste.

## 5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A identificação qualitativa das classes de metabólitos secundários presentes nos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl encontra-se na tabela 2.

**Tabela 2.** Análise fitoquímica preliminar dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl., sendo + positivo e – negativo para a presença da classe de composto analisada.

<i>Extratos Vegetais</i>			
Classe de Metabólitos Secundários	<i>A. mangium</i> Willd	<i>A. heterophyllus</i> Lam	<i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl
Flavonoide	-	+	+
Triterpeno	+	+	-
Esteroides	-	-	+
Cumarina	-	-	-
Saponina	+	-	+
Alcaloide	-	-	+
Tanino	+	+	-
Antraquinona	-	-	-

Dentre os extratos etanólicos foliares testados, o de *E. japonica* (Thunb.) Lindl foi o que apresentou maior diversidade de classes de metabólitos secundários, contendo flavonoides, saponina, esteroides e alcaloides, estando os dois últimos presentes apenas nesta espécie; ademais, apesar de compartilhar a saponina com *A. mangium* Willd, apresentou uma camada de espuma mais espessa do que esta, conforme pode ser observado na figura 16.

Quanto ao extrato de *A. mangium* Willd, além da presença de saponina foram identificados triterpenos e taninos; já para *A. heterophyllum* Lam, foram registradas a ocorrência de flavonoides, triterpeno e tanino.

**Figura 16** – Detecção de saponina nos extratos testados, onde o colchete destaca a camada de espuma. Da esquerda para a direita, extratos de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam.



Fonte: Acervo do autor.

Não foi verificada a presença de cumarina e antraquinona em nenhum dos extratos testados; contudo, cabe ressaltar que tal fato não é conclusivo para se afirmar que esses compostos não estão presentes nessas plantas, uma vez que a constituição fitoquímica de uma espécie apresenta variação conforme o órgão vegetal. Portanto, o resultado obtido permite inferir apenas que não foram identificadas cumarina e antraquinona nas folhas de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.

Um exemplo dessa diferença na constituição química entre os diferentes órgãos vegetais pode ser verificado no trabalho de Baliga e outros (2011), onde os autores citam os ésteres como principal constituinte do fruto de *A. heterophyllus* Lam. Além disso, os autores citam a presença de flavonoides, triterpenos e taninos no caule, bem como diferentes tipos de flavonas nas raízes; quanto às sementes, Gupta e outros (2011) encontraram, saponinas, alcaloides e polifenóis, enquanto Ajayi, Ajibade e Oderinde (2011) encontraram flavonoides, taninos e terpenos, porém não identificaram a ocorrência de saponina. Cabe ressaltar que o extrato foliar de *A. heterophyllus* Lam foi o único que – no presente trabalho – apresentou resultado negativo para a presença de saponina (figura 16).

Goulas e outros (2014) avaliaram o conteúdo de metabólitos secundários dos frutos de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. e encontraram polifenóis e flavonoides.

A caracterização fitoquímica, mesmo que preliminar, pode auxiliar no entendimento dos efeitos exercidos por extratos vegetais sobre outros organismos analisando-se as classes de compostos presentes. Flavonoides, por exemplo, são capazes de interferir na síntese de ATP agindo diretamente no mecanismo de fosforização (STELIND, apud REZENDE; TERRONES; REZENDE, 2011), impactando negativamente diversas reações necessárias ao desenvolvimento do organismo, além de induzir danos ao DNA (SIMÕES et al., 2017); já alcaloides e saponinas são compostos capazes de inibir a germinação, enquanto o crescimento vegetal é reduzido por alta concentração de taninos, que inibem a atividade das giberelinas (REZENDE; TERRONES; REZENDE, 2011).

### 5.3 TESTE PARA QUEBRA DE DORMÊNCIA:

A tabela 3 mostra o índice de germinação (IG) das sementes de *L. leucocephala* (Lam.) de Wit submetidas aos tratamentos para superação da dormência.



**Tabela 3.** Índice de Germinação (IG) para as sementes de *L. leucocephala* (Lam.) de Wit submetidas a tratamentos para quebra de dormência.

Tratamento	Nº de sementes	Sementes germinadas	IG (%)
Água à temperatura ambiente	90	17	18,8
Exposição a pleno sol	90	24	26,6
Imersão em água a 80°C por dez minutos	90	66	73,3

Aproximadamente 80% das espécies de leguminosas apresentam sementes com tegumento total ou parcialmente impermeável à água (OLIVEIRA, 2008), o que explica o baixo valor de germinação (18,8%) encontrado para o tratamento com água à temperatura ambiente, corroborando os resultados de Teles e outros (2000), que registraram cerca de 33% de IG nas mesmas condições experimentais. Por sua vez, o tratamento de imersão em água à 80°C por dez minutos mostrou-se bem-sucedido, ultrapassando 70% de germinação, indo ao encontro de Oliveira (2008) e mostrando-se o método mais eficaz dentre os testados no presente estudo.

Quanto à exposição à pleno sol, observa-se que, embora tenha promovido índice de germinação superior em relação ao tratamento com água à temperatura ambiente, o valor ainda está aquém dos 73% encontrados para o tratamento em água quente, demonstrando que luz não é um fator promotor de grandes variações na germinação de sementes dessa espécie. Deste modo, pode-se concluir que as sementes da espécie *L. leucocephala* (Lam.) de Wit apresentam fotoblastismo neutro (OLIVEIRA, 2008), característica importante para uma espécie invasora, visto que lhe confere a vantagem de germinação e desenvolvimento em áreas com certo grau de sombreamento.

Em relação aos testes aplicados para superação de dormência em *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster (tabela 4), observa-se que, apesar de essa ser característica marcante das sementes de gramíneas forrageiras, o IG do tratamento com água à temperatura ambiente foi muito superior ao encontrado por diversos autores, dentre eles Lacerda e outros (2010), que obtiveram apenas 3,75% de germinação quando as sementes não foram tratadas para quebra de dormência.

Exceto pela exposição à água em temperatura ambiente, nenhum dos tratamentos aplicados foram efetivos para elevar o percentual de germinação; ao contrário, na maioria dos casos a capacidade germinativa das sementes foi completamente inibida.

**Tabela 4.** Índice de Germinação (IG) para as sementes de *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster submetidas a tratamentos para quebra de dormência.

Tratamento	Nº de sementes	Sementes germinadas	IG (%)
Água à temperatura ambiente	90	58	64,4
Escarificação com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	90	0	0,00
Imersão em água a 80°C por 10 min	90	2	2,22
Imersão em água a 100°C por 2 min	90	0	0,00
Imersão em sumo de limão por 10 min	90	0	0,00
Imersão em sumo de laranja por 10 min	90	0	0,00

O tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, apesar de ser recomendado pela RAS (BRASIL, 2009) para espécies de gramíneas, não produziu resultados, corroborando os estudos de Dias (apud LACERDA et al., 2010) que, além de não ter verificado efeito positivo em *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, alertou para o fato de que a imersão em ácido sulfúrico pode ter efeitos distintos no IG conforme a espécie de *Urochloa* estudada.

A imersão em água à temperatura de 100°C por dois minutos inibiu completamente a germinação, resultado totalmente oposto ao encontrado por Lacerda e colaboradores (2010), que alcançaram 85,37% de germinação em *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster. Da mesma forma, o tratamento em água à 80°C por dez minutos – eficaz em *L. leucocephala* (Lam.) de Wit – não promoveu a germinação, indicando que a temperatura elevada afetou negativamente os mecanismos fisiológicos das sementes e a viabilidade do embrião.

#### 5.4 AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS FOLIARES:

Conforme Jansen (apud SANTANA; RANAL, 2004), a análise da germinação se torna completa quando engloba – além da porcentagem de germinação – a sua velocidade média e o tempo médio em que o processo ocorreu.

O tempo de germinação recomendado pela RAS para *U. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster é de 21 dias; todavia, Gaspar-Oliveira et al. (2008) verificaram que o período pode ser reduzido para 11 dias ou menos, desde que a germinação se estabilize, o que, no presente estudo, ocorreu em dez dias.

Considerando a capacidade de capturar a maior gama de grupos químicos, o extrato etanólico foi utilizado para avaliação alelopática. A toxicidade dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl foi associada à inibição da germinação das sementes de *L. sativa*, *A. cepa*, *L. leucocephala* e *U. brizantha* e às alterações no crescimento de suas radículas.

#### 5.4.1 Ensaio com *Lactuca sativa*

Considerando os valores dos índices de germinação (IG) e de alelopatia (IA) para as sementes de *L. sativa* (tabela 5), observou-se que houve uma redução significativa na germinação quando se aplicou o extrato de *A. mangium* Willd nas concentrações de 5 e 10 mg/mL; na maior concentração testada (50 mg/mL), houve completa inibição do processo germinativo, evidenciando – portanto - sua toxicidade. Os valores para o índice de alelopatia, por sua vez, aumentaram conforme a porcentagem de germinação era reduzida; segundo Balsalobre et. al. (2006), valores de IA acima de 50% podem ser considerados como significativos para efeito alelopático, o que ocorreu a partir da concentração de 5 mg/mL, confirmando o potencial alelopático do extrato de *A. mangium* Willd.

Os extratos de *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl tiveram o mesmo comportamento quanto ao IG, em um efeito concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração utilizada, maiores as concentrações de aleloquímicos e, conseqüentemente, menos sementes conseguiram emitir radícula; todavia, o IA só atingiu valores acima de 50% nas duas maiores concentrações testadas. Nota-se que, na concentração de 1 mg/mL do extrato de *A. heterophyllus* Lam, o valor do IA foi negativo, pois a germinação foi maior que a do controle, indicando um efeito alelopático positivo; entretanto, à medida que se elevou a concentração do extrato, o efeito tornou-se negativo.

Em suma, a germinação das sementes de *Lactuca sativa* foi afetada negativamente nas concentrações de 5, 10 e 50 mg/mL de todos os extratos testados, tendo a concentração máxima levado à inibição total deste parâmetro.

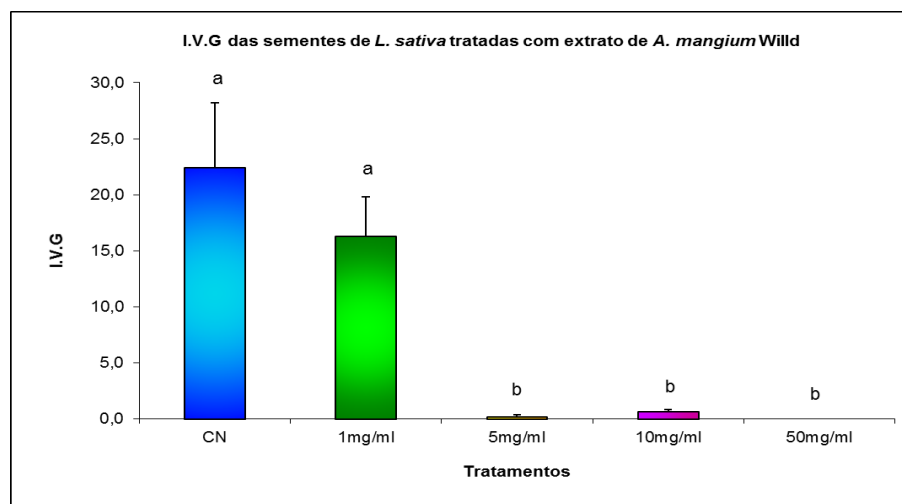
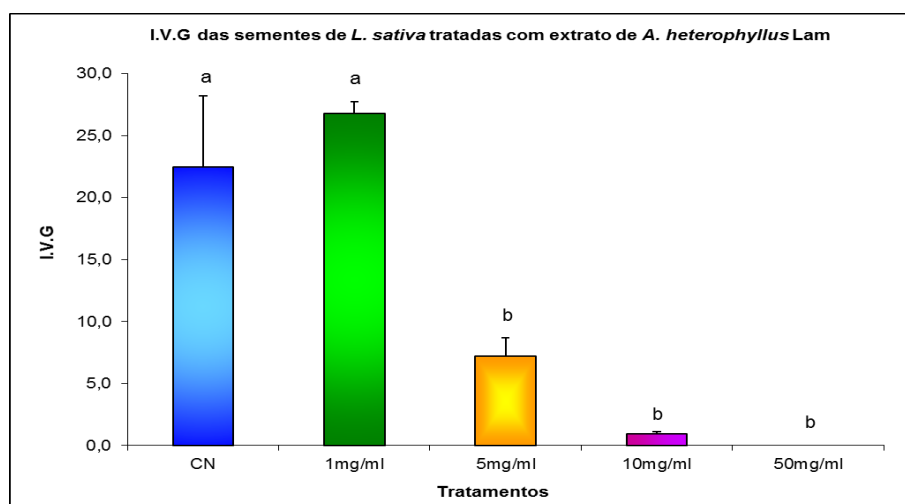
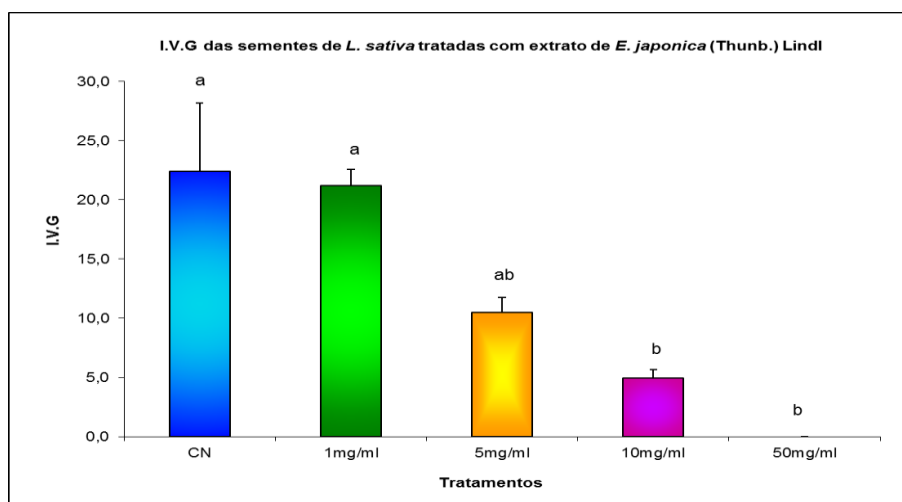
**Tabela 5.** Índices de Germinação (IG) e de Alelopátia (IA) para as sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Sementes germinadas	IG (%)	IA (%)
CN	-	85	94,44 a	-
<i>A. mangium</i> Willd	1	81	90,00 ab	4,70
	5	2	2,22 b	97,64
	10	8	8,88 b	90,59
	50	0	0,00 b	100,00
<i>A. heterophyllum</i> Lam	1	87	95,55 a	-1,17
	5	49	54,44 b	42,35
	10	8	8,88 c	90,59
	50	0	0,00 c	100,00
<i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl	1	84	93,33 a	1,17
	5	71	78,89 b	16,46
	10	35	38,89 c	58,82
	50	0	0,00 d	100,00

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das sementes tratadas com *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam sofreu significativa redução nas concentrações de 5 e 10 mg/mL, demonstrando que, além de interferir na capacidade de germinação das sementes, o extrato também atuou retardando a velocidade com que as radículas se desenvolveram. A concentração de 50 mg/mL não germinou, portanto, o IVG foi nulo (figura 17).

Em se tratando do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl, o IVG teve significativa redução em 10 mg/mL (uma vez que a concentração de 50 mg/mL não germinou); se compararmos o IG com o IVG, nota-se que, mesmo ocorrendo uma redução na porcentagem de germinação em 5 mg/mL, as sementes que conseguiram emitir radícula o fizeram com velocidade estatisticamente semelhante às do tratamento testemunha.

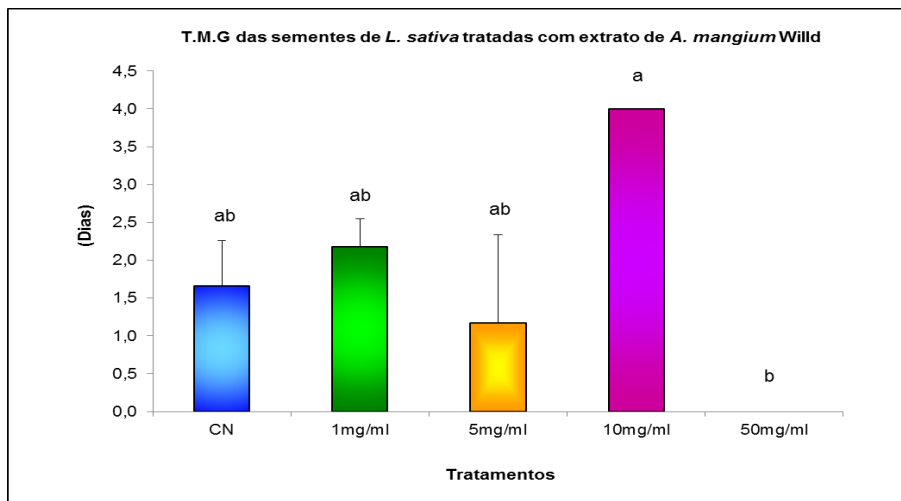
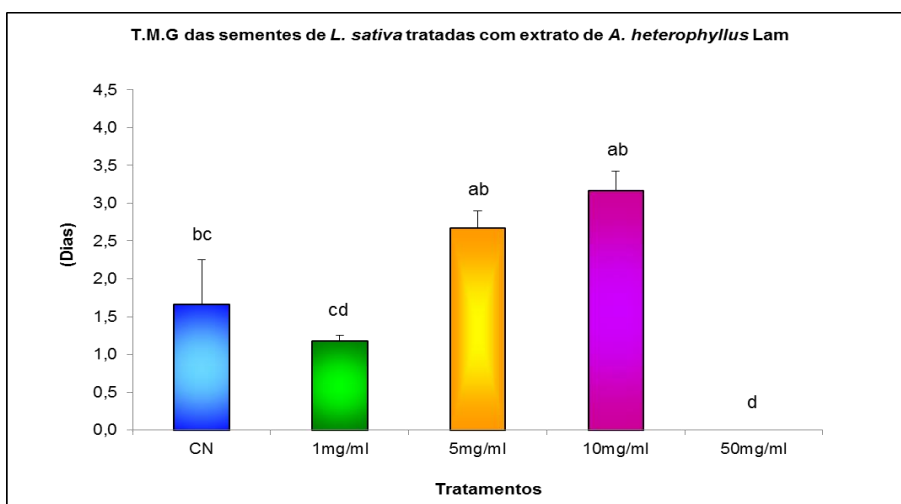
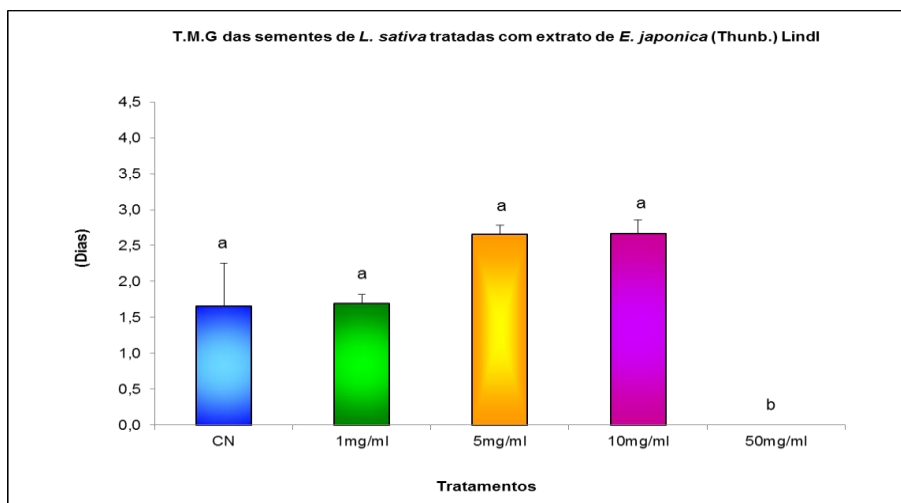
**Figura 17** – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

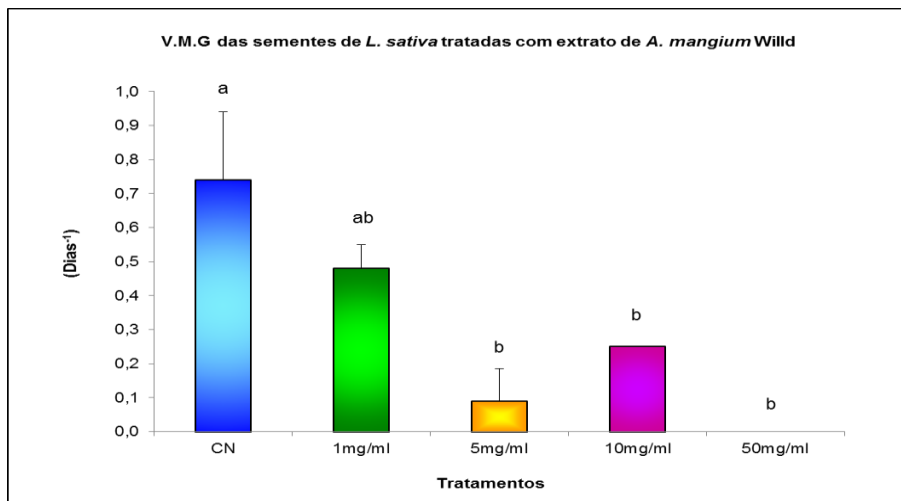
A figura 18, por sua vez, exhibe os resultados para o Tempo Médio de Germinação (TMG), enquanto a figura 19 trata da Velocidade Média de Germinação (VMG). Enquanto não houve alteração significativa no TMG para nenhum extrato testado, a VMG sofreu uma queda nas concentrações de 5 e 10 mg/mL de *A. mangium* Willd e em 10 mg/mL do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl, demonstrando que, embora o IVG tenha sido afetado, as sementes que conseguiram germinar nesses tratamentos o fizeram em menos tempo do que o controle.

O extrato de *A. heterophyllus* Lam não foi capaz de interferir significativamente nesses dois parâmetros avaliados.

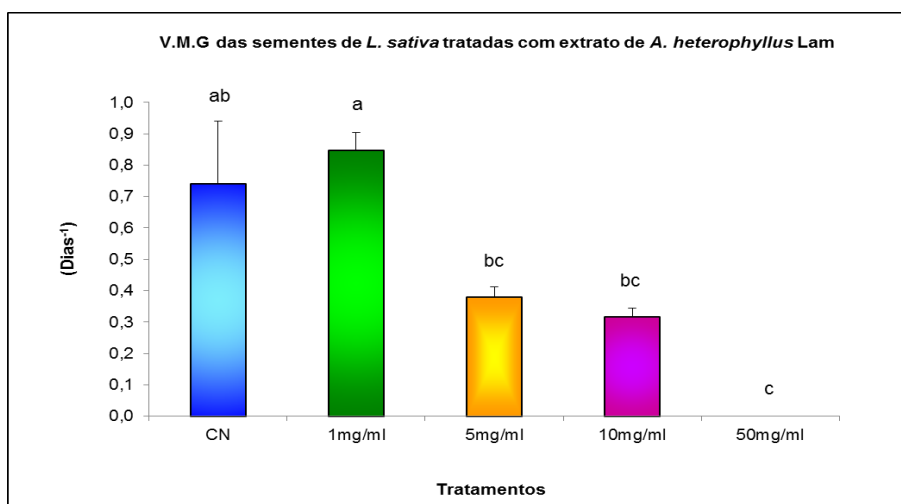
**Figura 18** – Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllus* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

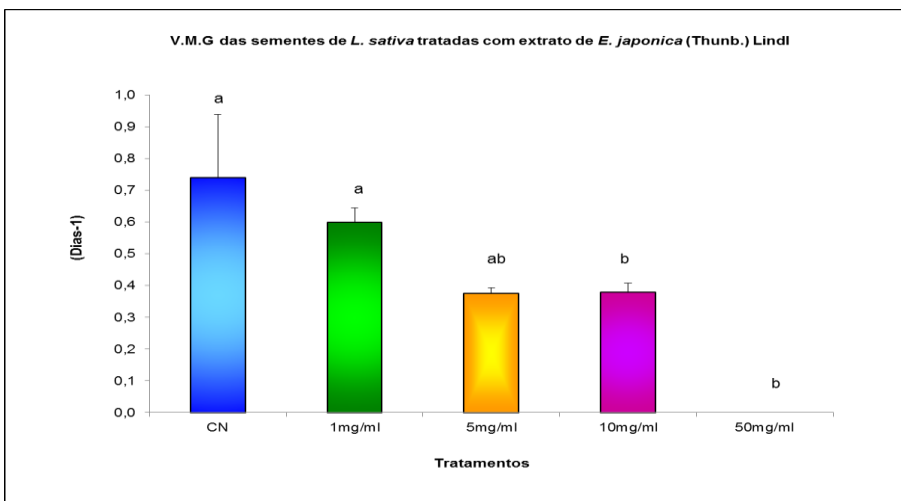
**Figura 19** – Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllus* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**

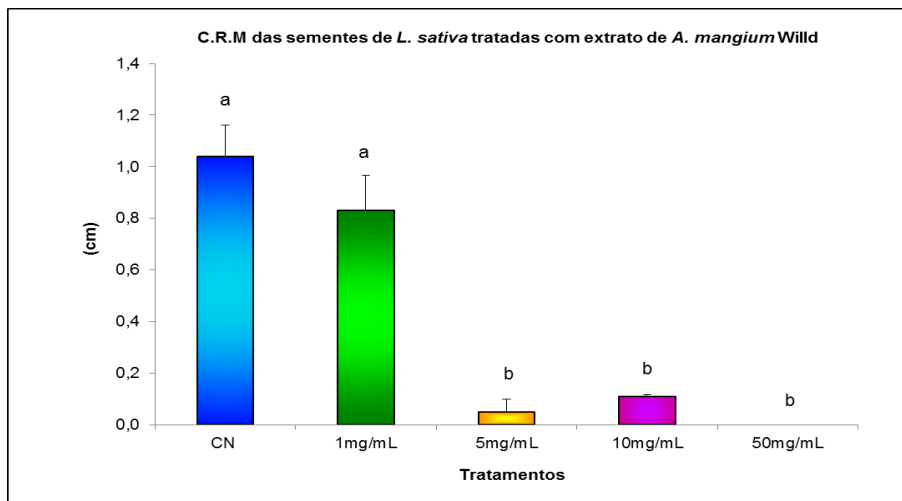


**(c)**

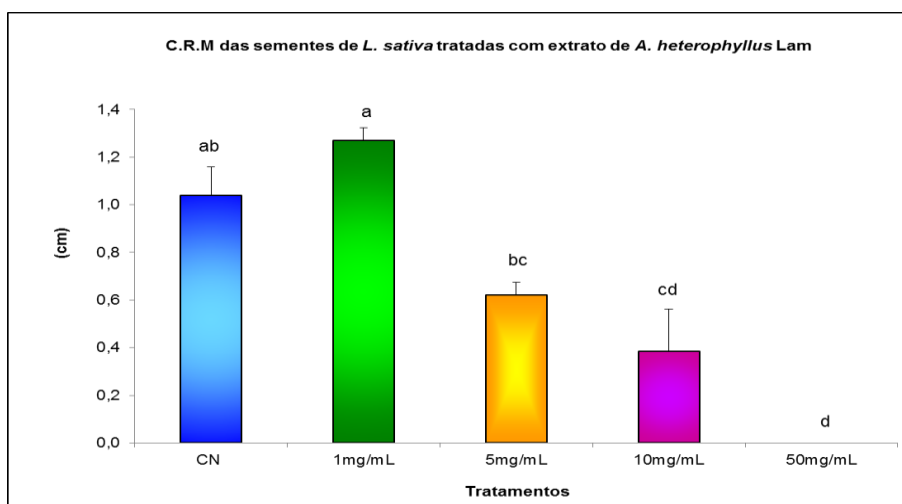


Ao analisar o crescimento das radículas submetidas ao tratamento com os três extratos foliares (figura 20), observa-se que, houve redução em 10 mg/mL; por sua vez, tanto o extrato de *A. mangium* Willd, quanto o de *E. japonica* (Thunb.) Lindl reduziram o tamanho das radículas nas concentrações de 5 e 10mg/mL, sendo esta diminuição mais acentuada quando da aplicação do primeiro extrato, chegando quase à zero. Se compararmos este parâmetro com a porcentagem de germinação, nota-se que este foi o extrato que mais efeito negativo teve sobre o desenvolvimento das sementes, pois, mesmo aquelas que conseguiram suplantat os efeitos deletérios do extrato na primeira fase do desenvolvimento (germinação), acabaram atingidas na expansão radicular; estes dados reforçam a importância em se considerar outros parâmetros além da germinação na avaliação alelopática.

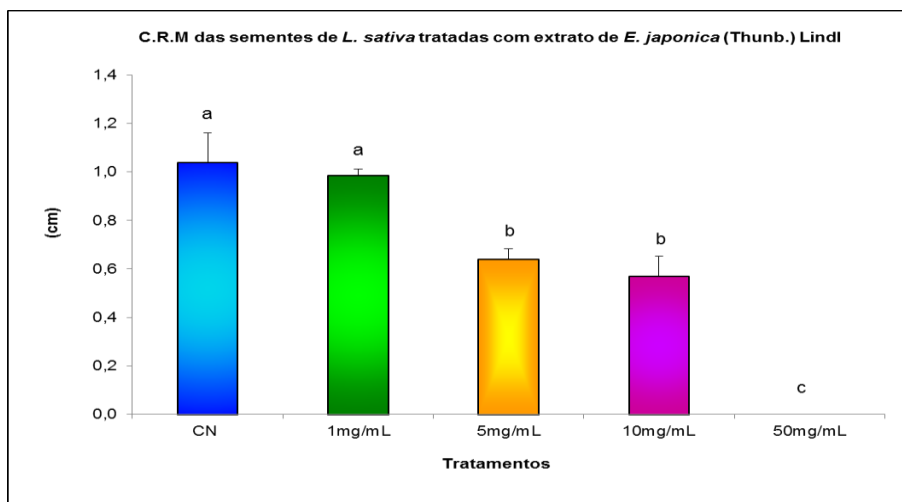
**Figura 20** – Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllus* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**



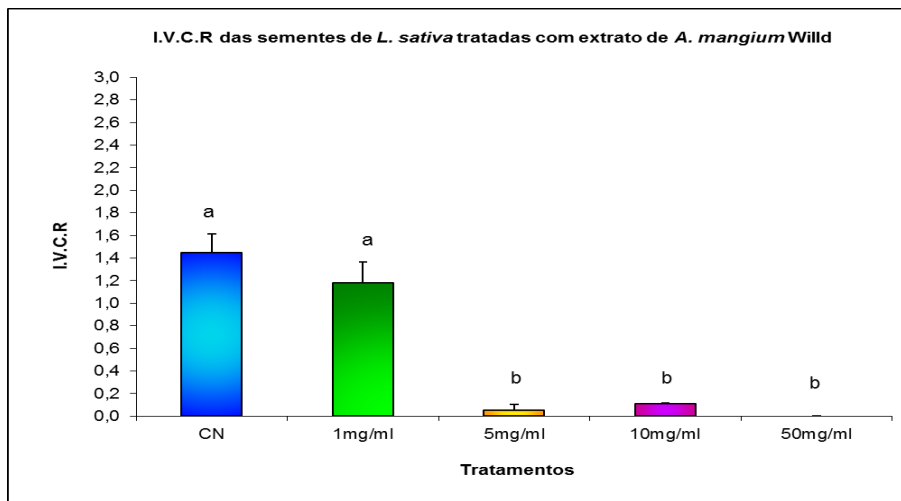
**(c)**

A presença de saponinas nos extratos de *E. japonica* (Thunb.) Lindl e *A. mangium* Willd, juntamente com taninos neste último, pode ter sido fator determinante na redução do comprimento radicular, uma vez que estes compostos são capazes de se ligarem à complexos proteicos e aos fosfolipídeos de membrana (no caso das saponinas), alterando o metabolismo celular e a capacidade de permeabilidade das membranas celulares, afetando negativamente a proliferação celular e o crescimento (SIMÕES et al., 2017). A presença de taninos e saponinas e a interação entre eles pode ser o motivo pelo qual o extrato de *A. mangium* Willd atuou mais fortemente na redução do desenvolvimento inicial de *L. sativa*.

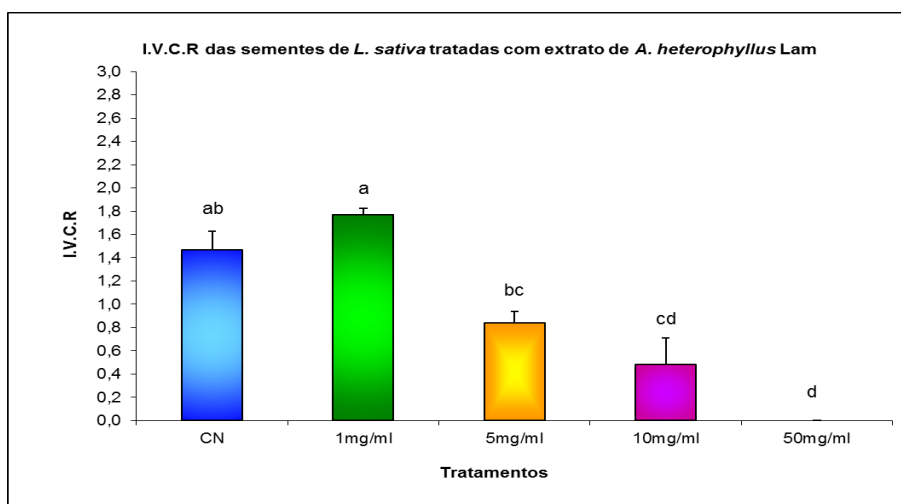
A interação entre tanino e saponina, intensificando os efeitos alelopáticos exercidos pelos dois metabólitos, pode ser, também, o motivo pelo qual a influência do extrato de *A. heterophyllum* Lam sobre a elongação das radículas foi significativa somente na concentração de 10 mg/mL, uma vez que – por não apresentar saponinas em sua constituição, foi necessário um acúmulo maior de tanino para manifestar a interferência supracitada.

O índice de velocidade de crescimento das radículas (IVCR), apresentado na figura 21, foi reduzido significativamente nas concentrações de 5 e 10 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd, 10 mg/mL de extrato de *A. heterophyllum* Lam e 5 e 10 mg/mL do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Esse comportamento corrobora o efeito danoso dos extratos (nas concentrações citadas) sobre o desenvolvimento das raízes, visto que estas não tiveram somente seu tamanho comprometido, mas o tempo necessário para sua elongação foi significativamente retardado.

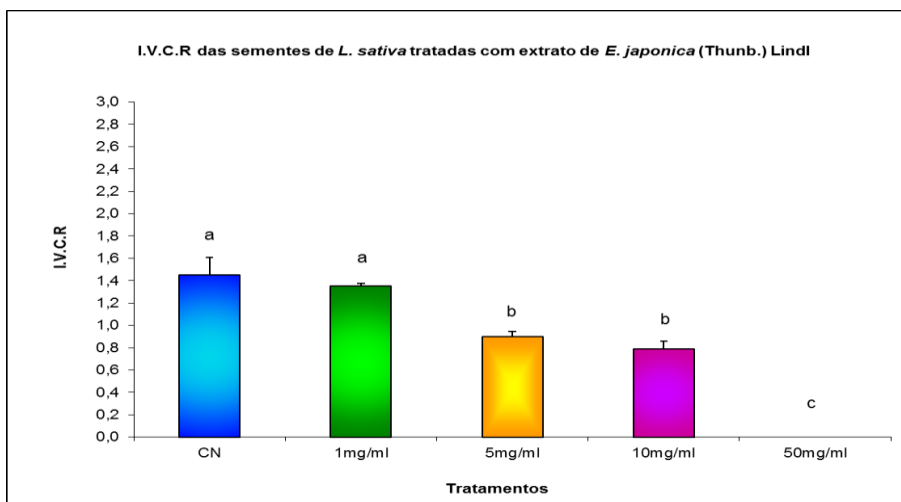
**Figura 21** – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**



**(c)**

Ao estudar os efeitos do extrato de partes aéreas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, espécie exótica amplamente utilizada no Brasil para medicina natural, Melhorança-Filho e outros (2012) reportaram a ocorrência de interferência negativa no desenvolvimento radicular e do hipocótilo de *L. sativa*, bem como no índice de germinação em um efeito concentração dependente.

#### 5.4.2 Ensaio com *Allium cepa*

Em relação aos efeitos sobre as sementes de *Allium cepa*, os extratos de *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam afetaram negativamente a germinação em todas as concentrações, levando à inibição completa deste parâmetro em 50 mg/mL do extrato de *A. heterophyllum* Lam (tabela 6); já o extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl afetou o IG apenas nas concentrações de 10 e 50 mg/mL.

Quanto ao IA, valores acima de 50% só foram atingidos na maior concentração dos extratos de *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl; já para as sementes tratadas com o extrato de *A. mangium* Willd, tal valor foi atingido a partir de 5 mg/mL.

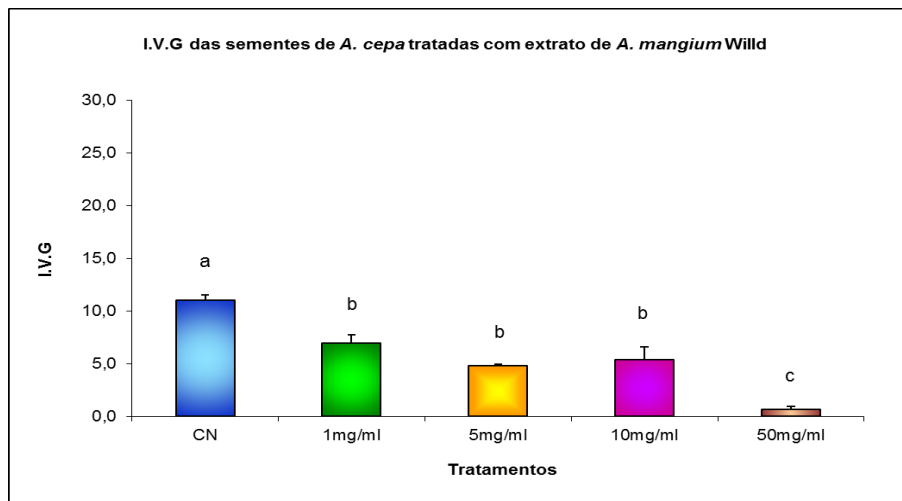
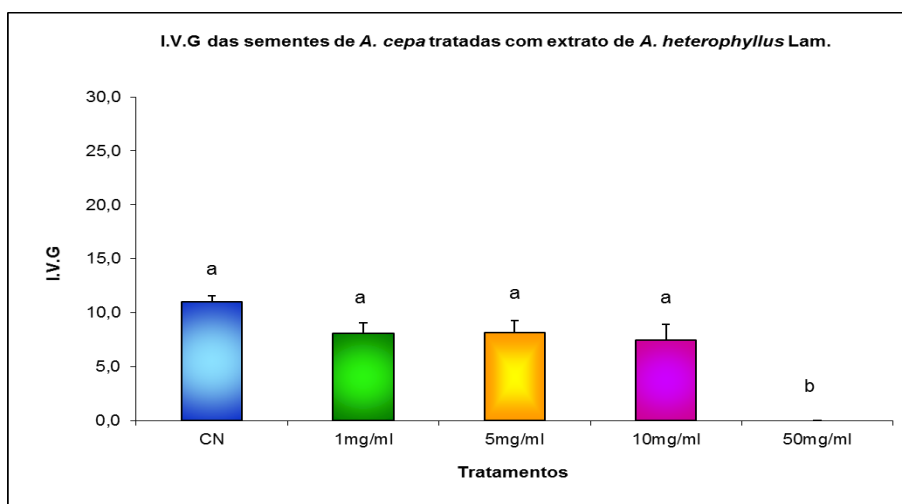
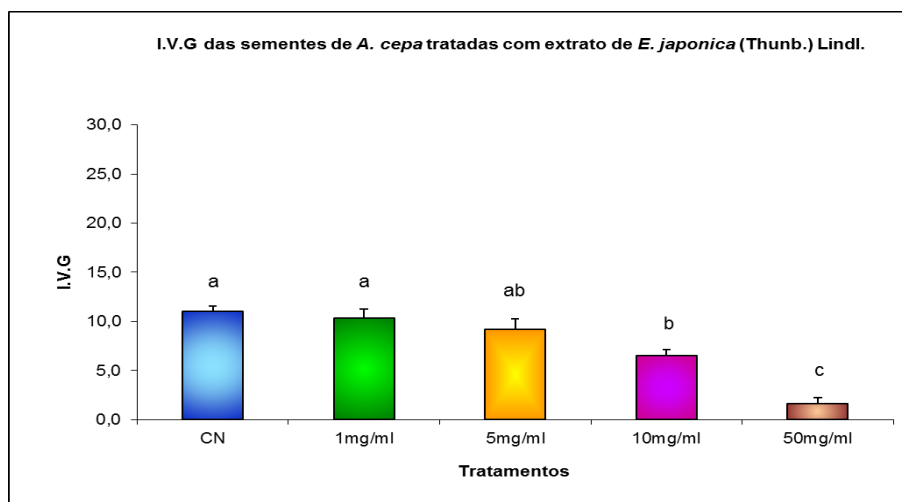
**Tabela 6.** Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Sementes germinadas	IG (%)	IA (%)
CN	-	68	75,55 a	-
<i>A. mangium</i> Willd	1	45	50 b	33,81
	5	28	31,11 c	58,82
	10	33	36,66 bc	51,47
	50	5	5,55 d	92,65
<i>A. heterophyllum</i> Lam	1	42	46,66 b	38,23
	5	45	50,00 b	33,81
	10	38	42,22 b	44,11
	50	0	0,00 c	100,00
<i>E. japonica</i> (Thunb.)	1	54	60,00 ab	20,58
	5	58	64,44 ab	14,70
	10	46	51,11 b	32,34
	50	12	13,33 c	82,35

Apesar desse comportamento em relação ao índice de alelopatia, o extrato de *A. mangium* Willd reduziu significativamente o IVG em todas as concentrações testadas (figura 22). Quanto aos tratamentos com *A. heterophyllus* Lam, apesar de ter ocorrido redução da porcentagem de germinação em todos os tratamentos, não houve alteração no IVG em comparação ao controle; cabe ressaltar que houve inibição total da germinação na concentração de 50 mg/mL deste extrato, motivo pelo qual não foi possível avaliar os demais parâmetros para este tratamento.

O tratamento com *E. japonica* (Thunb.) Lindl. nas concentrações de 10 e 50 mg/mL afetou não só a capacidade germinativa das sementes de *A. cepa*, mas reduziu também o IVG. Rodrigues e Lopes (apud TAVEIRA; SILVA; LOIOLA, 2013) mencionaram que os aleloquímicos liberados no ambiente podem interferir positiva ou negativamente sobre a germinação e demais aspectos do desenvolvimento vegetal, fato observado no presente estudo.

**Figura 22** – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

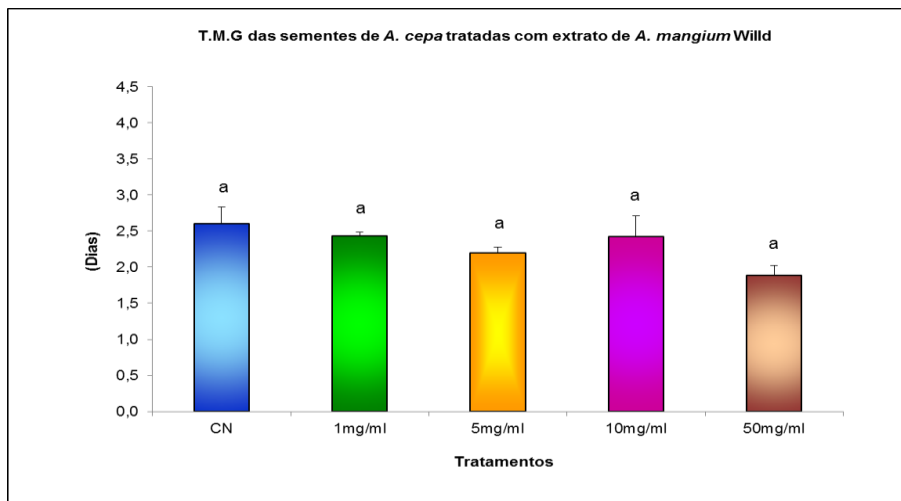
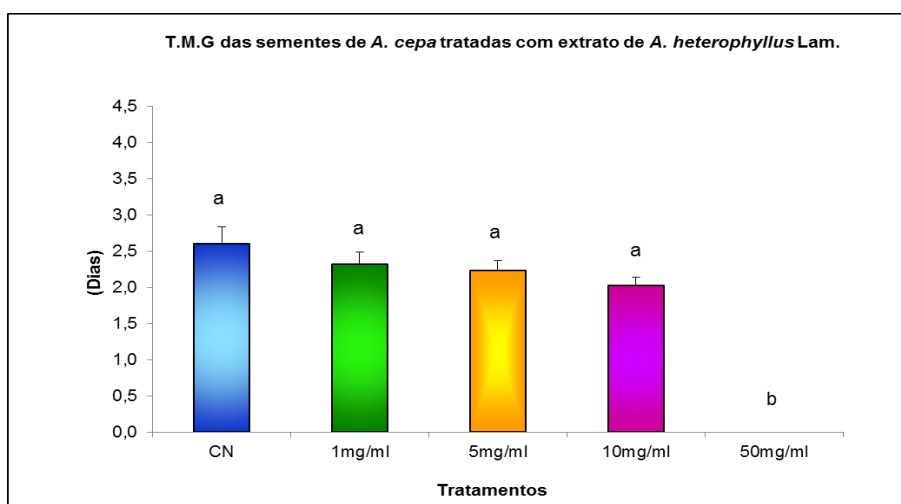
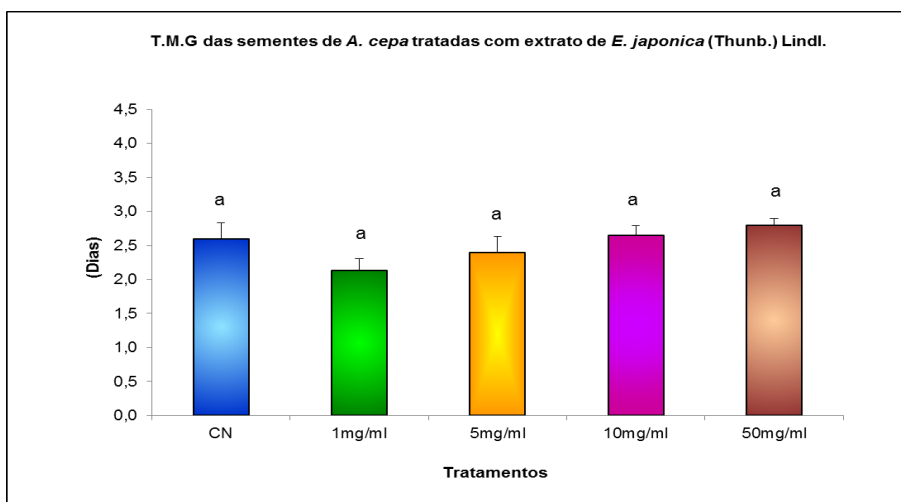
**(a)****(b)****(c)**

Taveira, Silva e Loiola (2013), em seus estudos com espécies do gênero *Erythroxylum*, verificaram que, enquanto algumas espécies alteravam significativamente o IVG de *A. cepa*, outras não produziam nenhuma modificação, indicando a importância da avaliação de diferentes espécies, mesmo sendo estas pertencentes ao mesmo táxon.

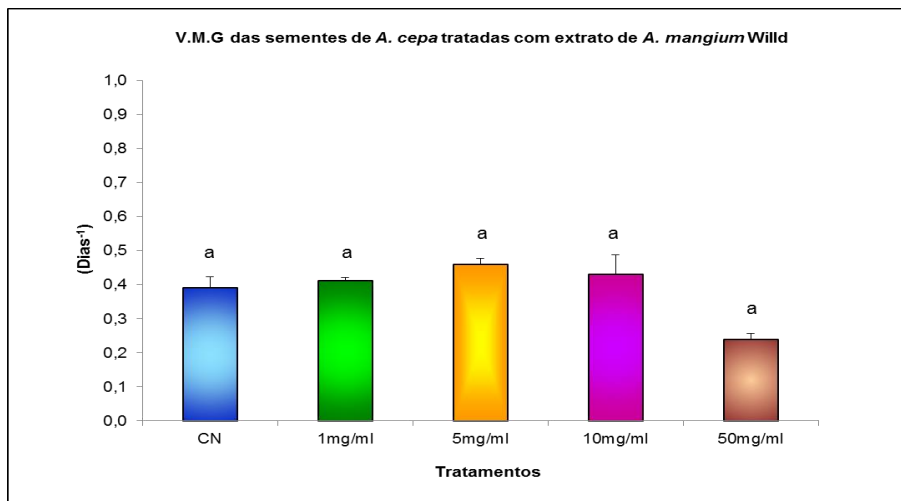
Apesar das alterações nos índices de germinação e de velocidade de germinação, nenhuma concentração do extrato de nenhuma planta testada interferiu no tempo médio de germinação (figura 23) nem na velocidade média deste processo (figura 24), ou seja, apesar de algumas concentrações dos extratos conseguirem reduzir a quantidade de sementes germinadas e afetarem seu IVG, aquelas que conseguiram resistir apresentaram tempo e velocidade de germinação similares ao tratamento testemunha.



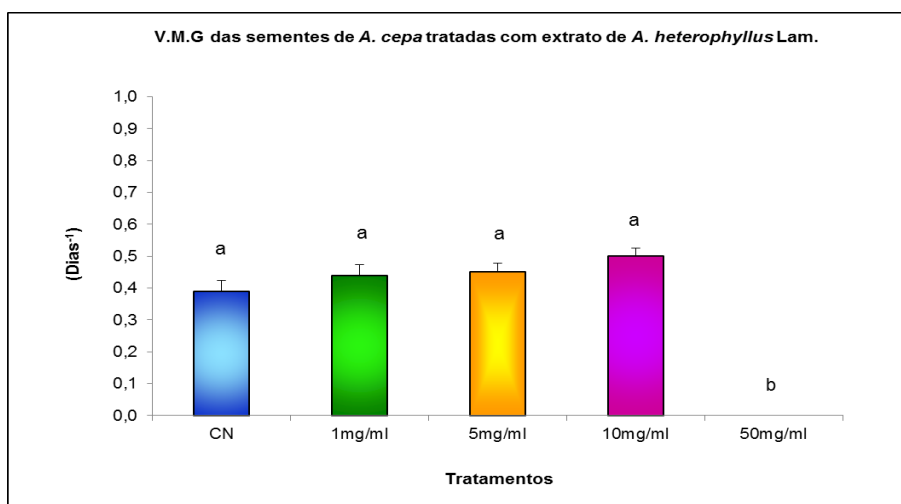
**Figura 23** – Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

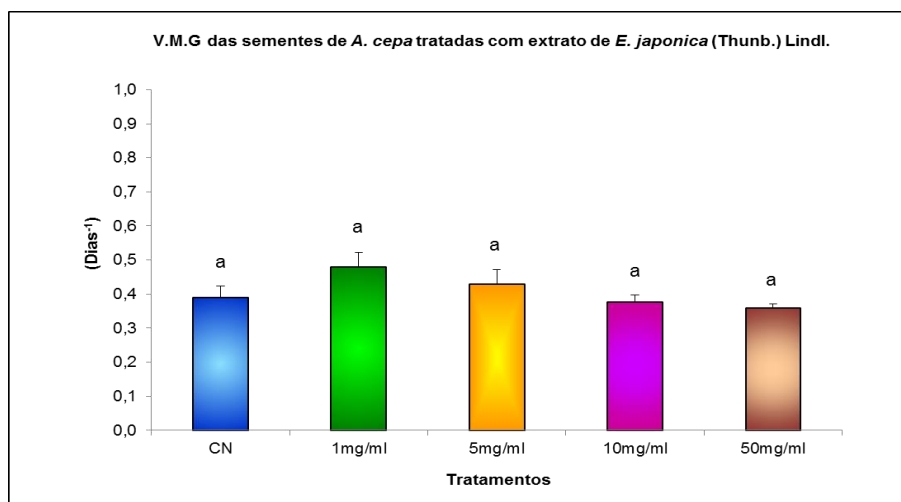
**Figura 24** – Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



(a)



(b)

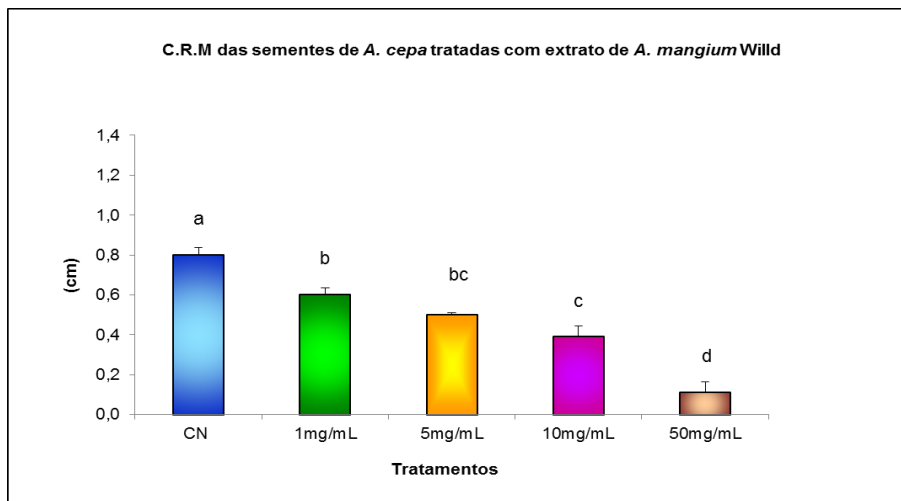


(c)

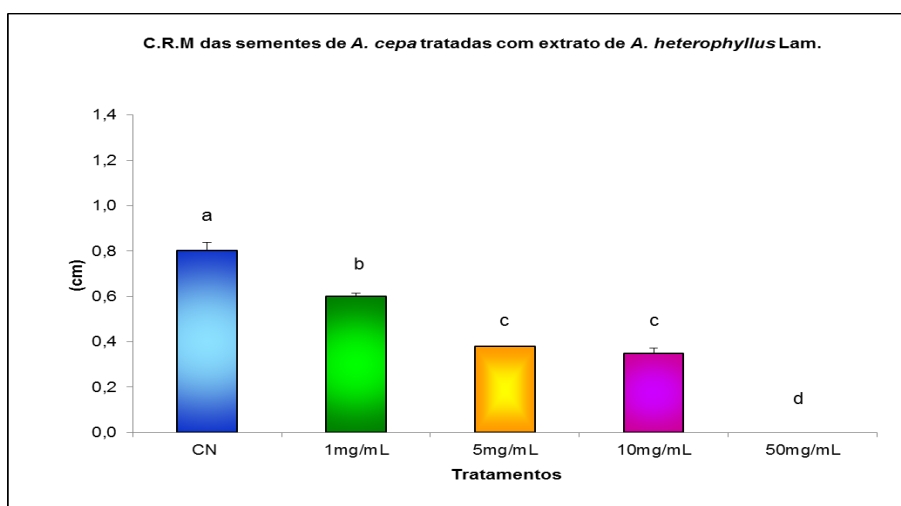
Diferentemente dos resultados verificados no presente estudo, Grisi e outros (2013) identificaram redução no TMG das sementes de *A. cepa* quando tratadas com extrato foliar de *Sapindus saponaria* L.

Quanto ao crescimento das radículas de *A. cepa*, os extratos de *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam reduziram o comprimento das mesmas em todas as concentrações testadas; neste último, a concentração de 10 mg/mL inibiu o crescimento das radículas já no terceiro dia. Para *E. japonica* (Thunb.) Lindl., somente a menor concentração (1 mg/mL) não interferiu significativamente nesse parâmetro (figura 25). A figura 26 demonstra a redução ocorrida no comprimento das radículas.

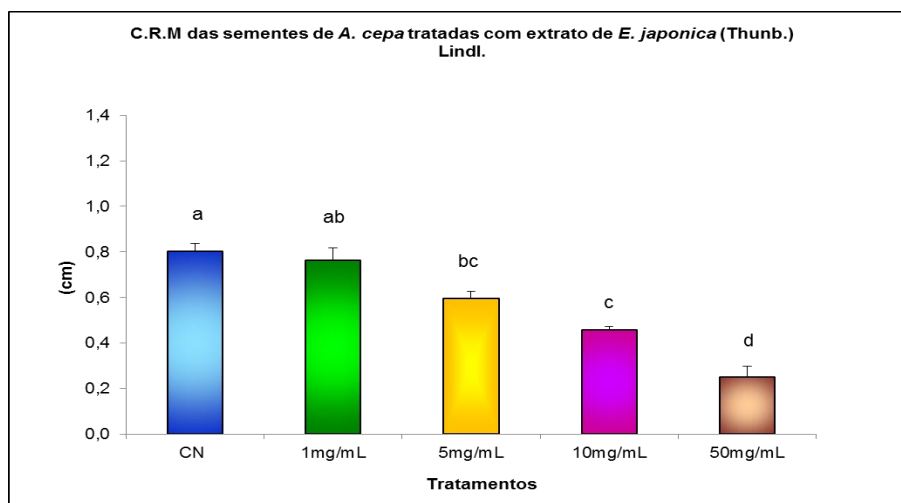
**Figura 25** – Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**



**(c)**

**Figura 26** – Alteração no comprimento radicular de *Allium cepa*, onde: **(a)** - controle negativo; **(b)** – tratamento.



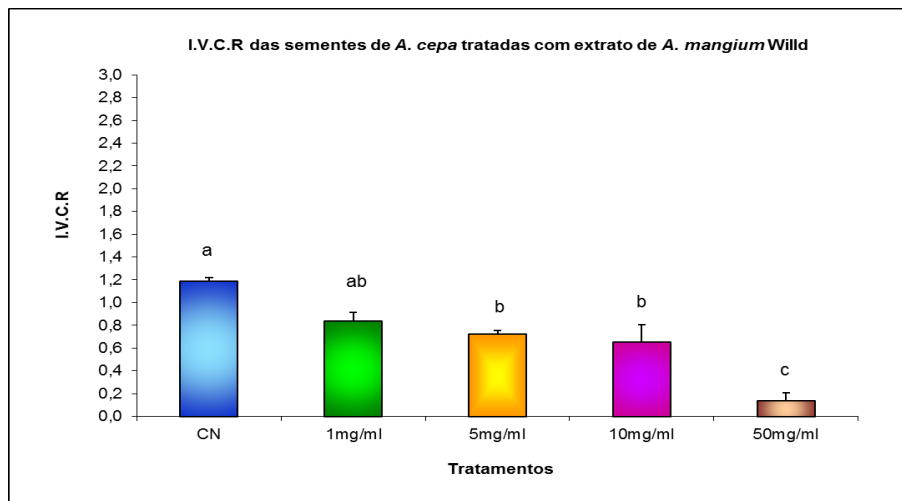
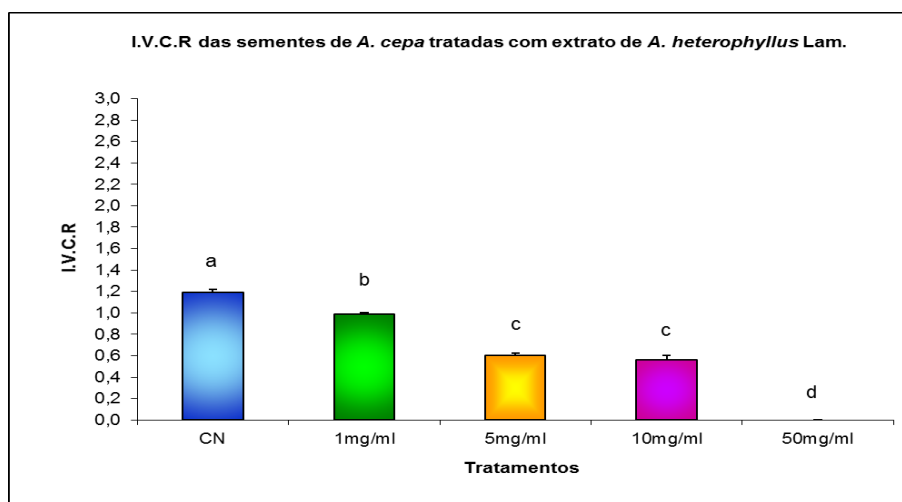
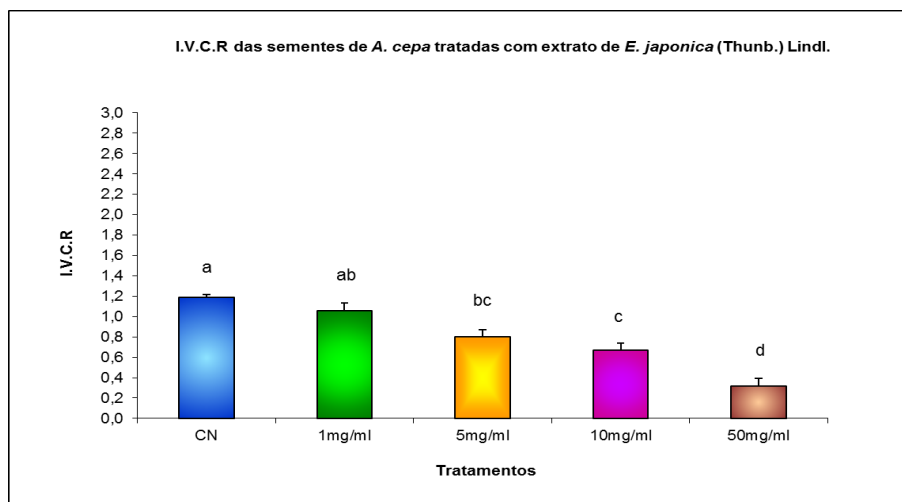
Fonte: Acervo do autor

O efeito redutor no comprimento radicular de *A. cepa* em uma relação concentração-dependente também foi observado por Timothy e outros (2014) ao analisar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato foliar de *Icacina trichantha* Oliv. Efeitos alelopáticos sobre radículas e hipocótilos de *Allium cepa* também foram verificados por Fonseca e outros (2015) em seu trabalho utilizando diferentes frações de extratos de *Smilax* sp., sendo as frações diclorometânica e hexânica as responsáveis pelos resultados encontrados.

Diversos autores afirmam que a interferência no crescimento radicular pode ser resultado de alterações na permeabilidade celular e no processo de replicação e tradução do material genético, interferência nos receptores de membrana, modificação na respiração ou outros aspectos do metabolismo (RANAL, 2016 e FERREIRA, 2004 apud TAVEIRA; SILVA; LOIOLA, 2013). As espécies testadas no presente estudo apresentam metabólitos capazes de exercerem os efeitos supracitados, como saponinas em *A. mangium* Willd e *E. japonica* (Thunb.) Lindl., capaz de se ligar aos fosfolipídeos, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, taninos em *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam, cuja ligação à complexos proteicos pode causar redução na proliferação celular e – consequentemente – no crescimento do organismo, além de alcaloides em *E. japonica* (Thunb.) Lindl., que podem afetar vários aspectos do metabolismo por interferirem na comunicação entre as células.

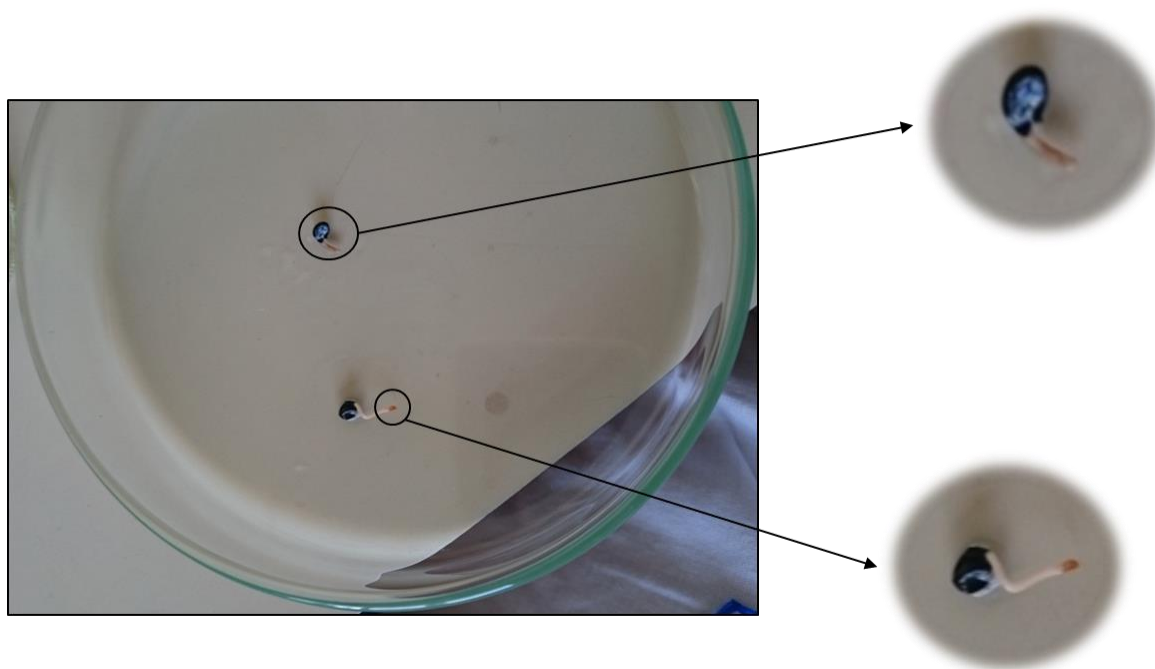
O IVCR, apresentado na figura 27, sofreu queda em todas as concentrações de *A. heterophyllus* Lam e a partir de 5 mg/mL dos demais extratos, sendo este um efeito concentração-dependente. Nota-se que a maior concentração testada e, portanto, a que contém maior acúmulo de aleloquímicos, foi responsável por provocar redução mais acentuada nesse parâmetro.

**Figura 27** – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** - *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

As raízes expostas ao extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., nas duas maiores concentrações, apresentaram escurecimento das pontas das radículas, não chegando, porém, a evoluir para uma condição necrótica (figura 28).

**Figura 28** – Radículas de *Allium cepa* com pontas escurecidas, resultante dos tratamentos com as concentrações de 10 e 50 mg/mL do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl.



Fonte: Acervo do autor

Tal efeito pode ser devido à existência de alcaloides na composição química do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., haja vista a capacidade destes compostos em interagir com diferentes alvos moleculares, influenciando negativamente a comunicação intercelular e comprometendo – assim – o metabolismo (SIMÕES et al., 2017); além disso, alteração na permeabilidade celular devido às saponinas, também pode ter auxiliado na mudança de coloração das radículas. A interação entre esses dois aleloquímicos pode explicar o fato de as sementes tratadas com extrato de *A. mangium* Willd não terem manifestado tal mudança de coloração, uma vez que não foram identificados alcaloides nas folhas desta espécie.

#### 5.4.3 Ensaio com *Leucaena leucocephala*

Na tabela 7 estão os valores de IG e IA para as sementes de *Leucaena leucocephala*. Ao contrário dos resultados obtidos para *L. sativa* e *A. cepa*, nenhuma concentração dos extratos afetou significativamente a capacidade de germinação



desse organismo-teste. O IA para as concentrações de 1 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd e 1 e 10 mg/mL de *A. heterophyllum* Lam apresentou valores negativos, indicando um efeito positivo dos extratos nessas concentrações.

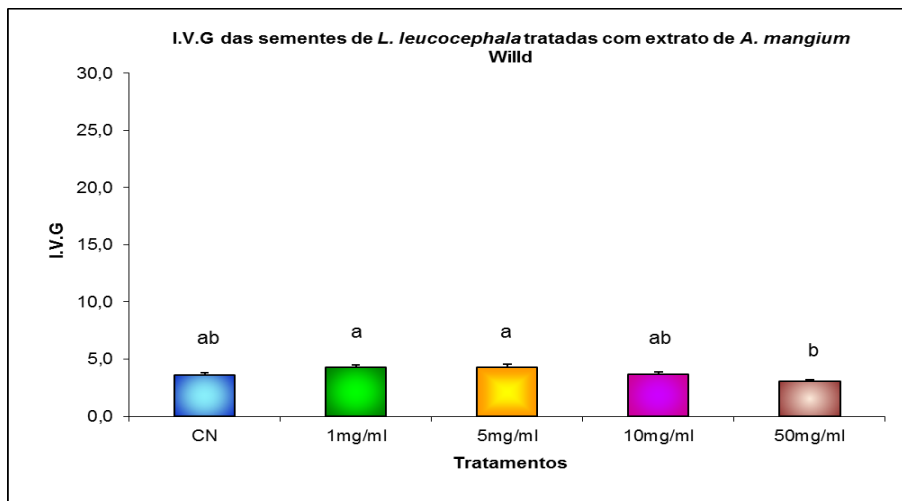
Esses resultados demonstram a alta resistência dessa espécie invasora a fatores adversos, característica fundamental para garantir o sucesso na ocupação de novos habitats, o que explica sua sobrevivência até mesmo nos locais mais inóspitos, como valas de esgoto, beira de rios contaminados, etc.

**Tabela 7.** Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

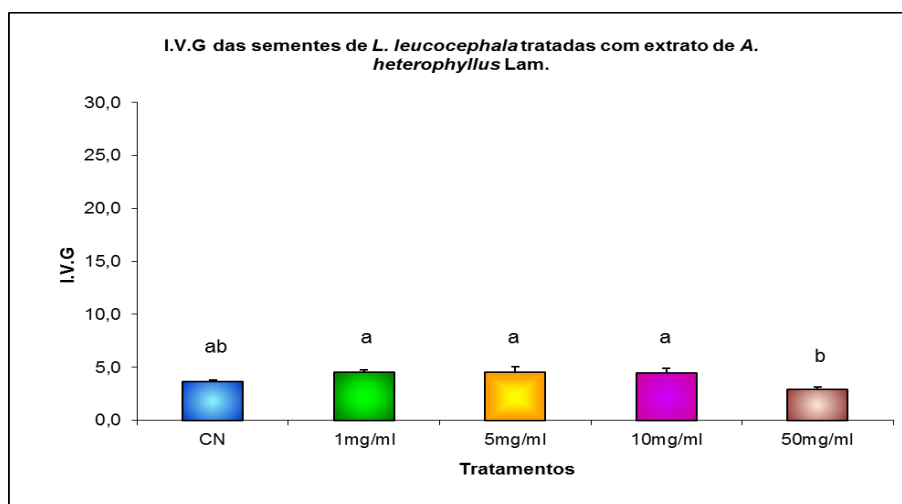
Extrato	Concentração (mg/mL)	Sementes germinadas	IG (%)	IA (%)
CN	-	67	74,44 a	-
<i>A. mangium</i> Willd	1	71	78,88 a	-5,96
	5	66	73,33 a	1,49
	10	65	72,22 a	2,98
	50	59	65,55 a	11,94
<i>A. heterophyllum</i> Lam	1	69	76,66 a	-2,98
	5	60	66,66 a	10,45
	10	72	80,00 a	-7,46
	50	56	62,22 a	16,41
<i>E. japonica</i> (Thunb.)	1	58	64,44 a	13,43
	5	56	62,22 a	16,41
	10	67	74,44 a	0,00
	50	51	56,66 a	23,88

Corroborando os dados de IG, nenhum extrato alterou de forma significativa o IVG, conforme pode ser observado na figura 29.

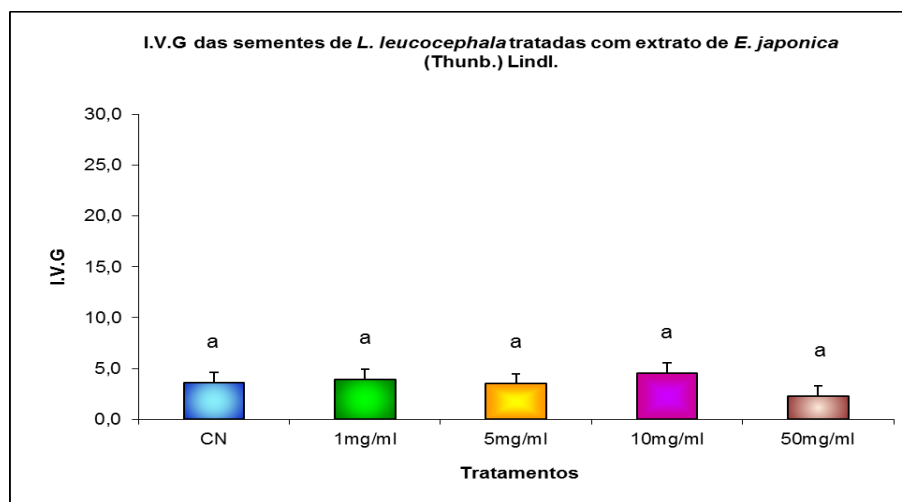
**Figura 29** – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



(a)



(b)

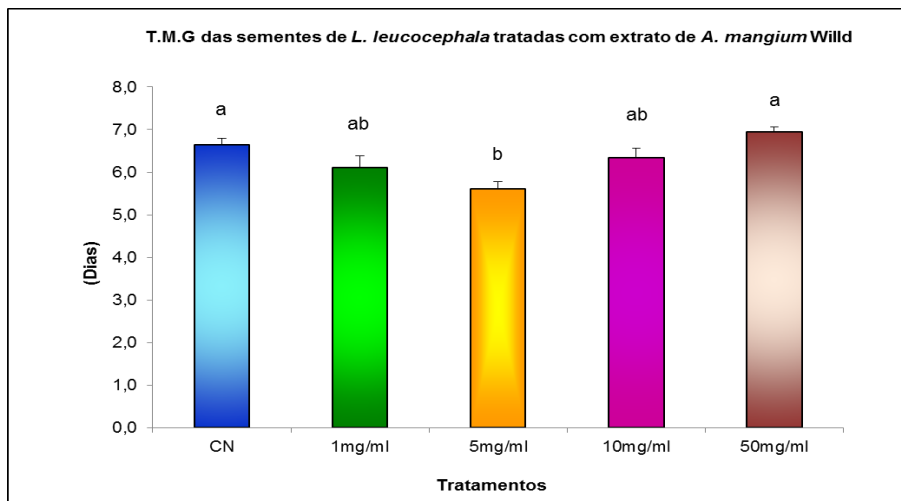


(c)

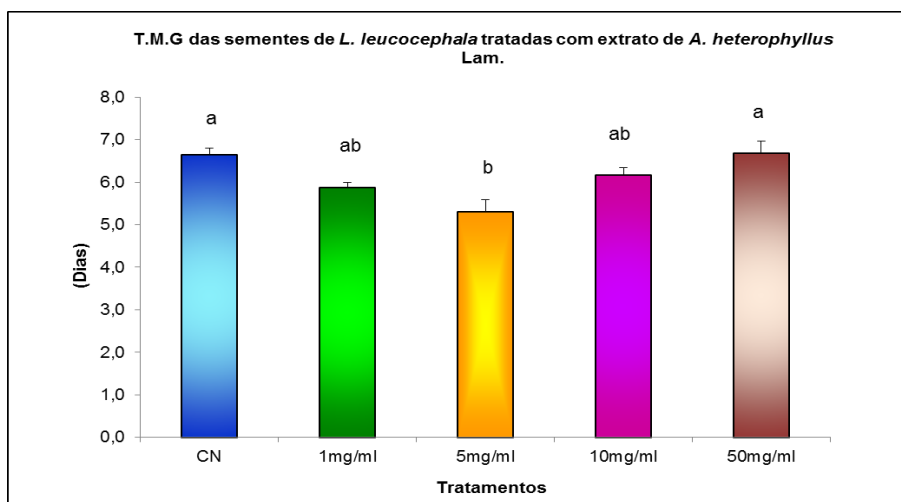
Quanto ao TMG, o extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., não apresentou alterações significativas (figura 30); todavia, embora significativamente semelhante ao tratamento testemunha, é possível perceber que as sementes tratadas com a concentração de 50 mg/ml do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. levaram mais tempo para germinar, indicando que as sementes, embora resistentes, começaram a ser afetadas pelo extrato.

Houve alteração significativa para este parâmetro apenas nas sementes de *L. leucocephala* tratada com 5 mg/ml dos extratos de *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam, cuja média de dias necessários para a germinação foi menor em comparação ao controle, ou seja, ocorreu uma interferência positiva no tempo médio de germinação.

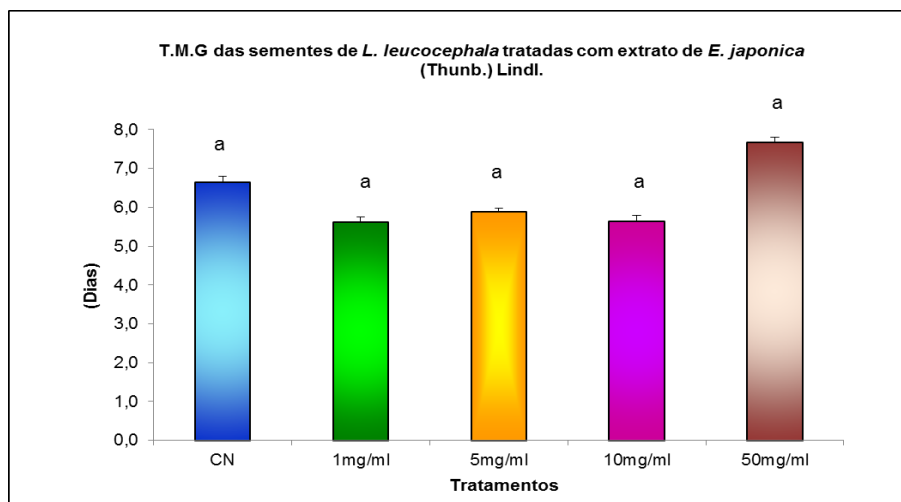
**Figura 30** – Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**

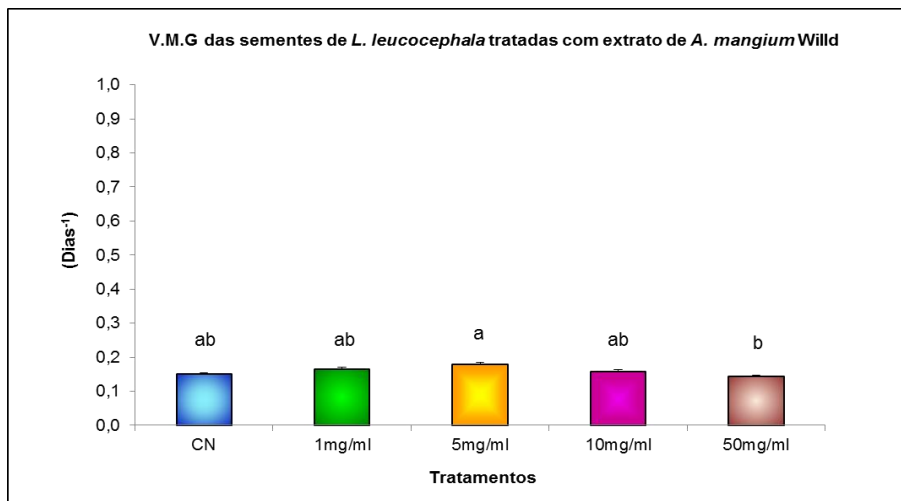


**(c)**

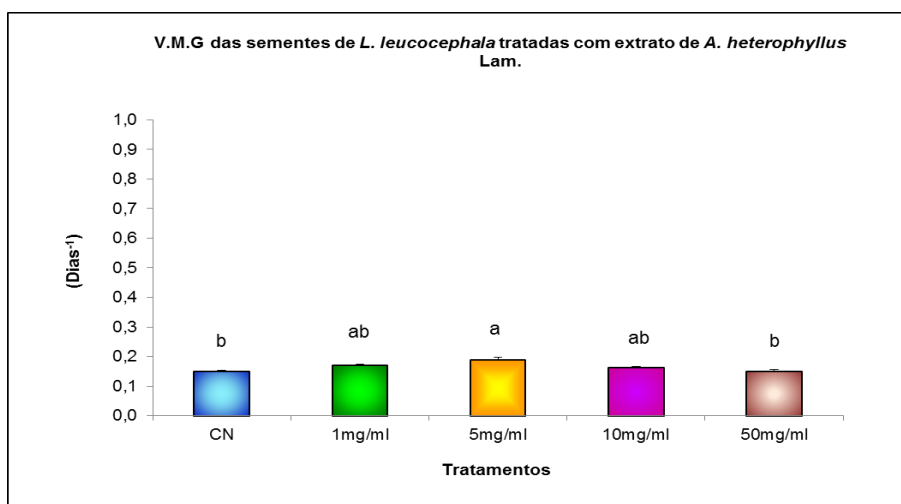
Essa curva de concentração-resposta em forma de U é atípica, uma vez que o padrão esperado é sigmoidal, onde baixas concentrações de um agente não exercem efeito, mas – à medida que estas se elevam – os resultados tornam-se significativos, até chegar a um ponto de saturação (REYNOLDS, 2010; DAVIDSON, 2014). No caso da *L. leucocephala*, a concentração ótima dos extratos citados foi atingida na base da curva (5 mg/mL), sendo que a partir desse ponto o efeito voltou a ser nulo. Segundo Baldi e Bucherelli (2005), essa resposta pode ser explicada pela interação entre os metabólitos presentes nos extratos testados e o organismo tratado, de modo que uma dose baixa estimulará a liberação de compostos celulares que atuarão produzindo efeito significativo; todavia, à medida que se elevam as concentrações e, conseqüentemente, as quantidades de metabólitos, ocorrerá maior liberação dessas substâncias que, ao invés de potencializar o efeito, em um mecanismo de feedback podem estimular ou inibir a produção de outra, resultando na perda do efeito atingido nas menores concentrações.

Em relação à velocidade média de germinação, esta foi afetada somente nas sementes expostas à concentração de 5 mg/mL do extrato de *A. heterophyllus* Lam (figura 31), indicando que estas foram mais lentas no processo de germinação. Embora essa seja uma curva concentração-resposta em forma de sino ou U invertido, a explicação pode ser a mesma dada para a curva em U (REYNOLDS, 2010), uma vez que dentre os diversos fatores envolvidos na absorção das substâncias pelo organismo afetado estão os mecanismos envolvidos para vencerem a barreira da membrana plasmática, como a ligação com sítios receptores e de armazenamento e a capacidade de ativar/desativar complexos enzimáticos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

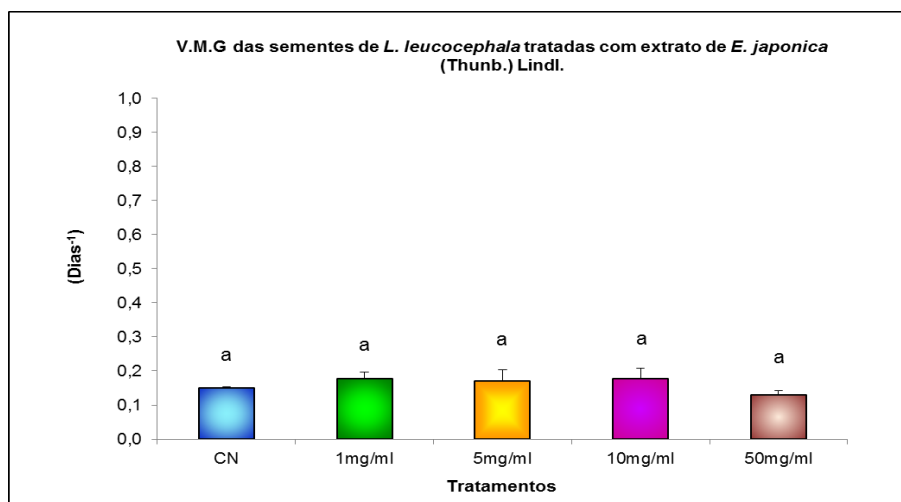
**Figura 31** – Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



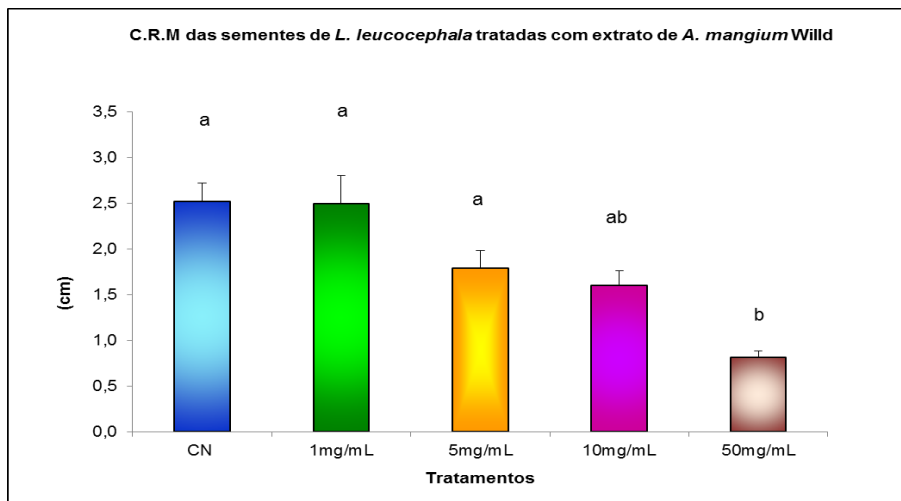
**(b)**



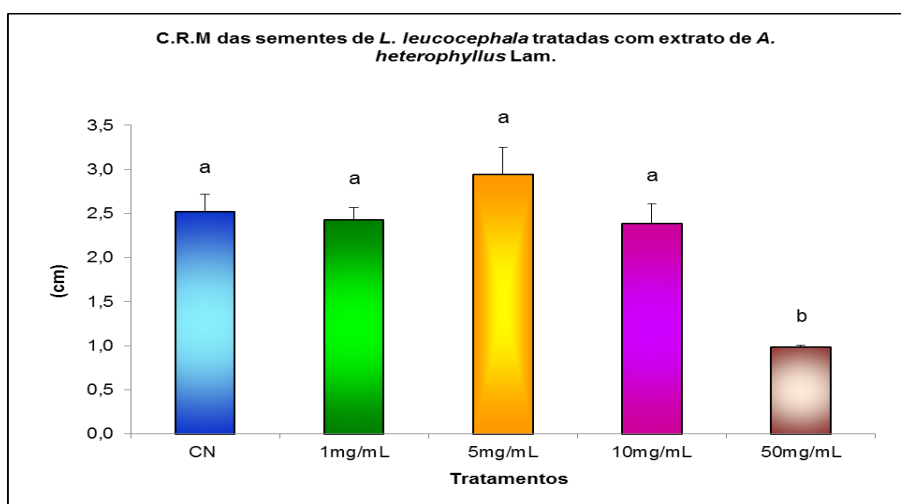
**(c)**

O desenvolvimento das radículas de *L. leucocephala* foi avaliado quanto ao crescimento (figura 32) e ao índice de velocidade de crescimento (figura 33). Todos os extratos testados causaram queda significativa no tamanho das radículas apenas na maior concentração, ou seja, 50 mg/mL, reforçando o fato de que o acúmulo dos metabólitos secundários foi capaz de afetar a emissão radicular de *L. leucocephala*. Os dados do IVCR corroboram o fato, demonstrando que os aleloquímicos não agiram reduzindo somente a capacidade de alongação radicular, mas também a velocidade de expansão do órgão.

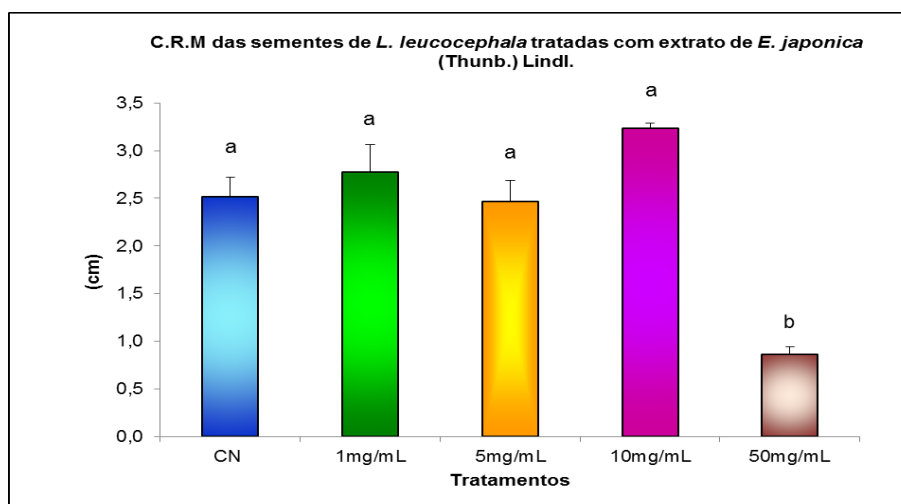
**Figura 32** – Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** - *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



(a)



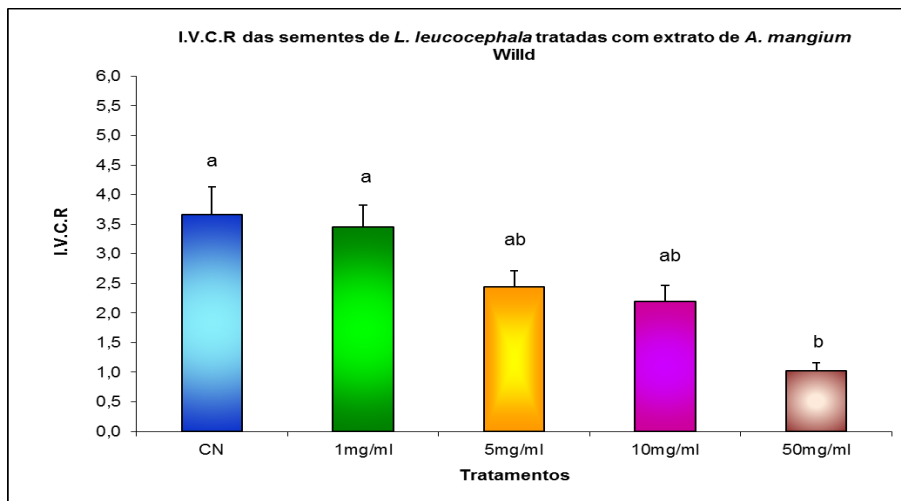
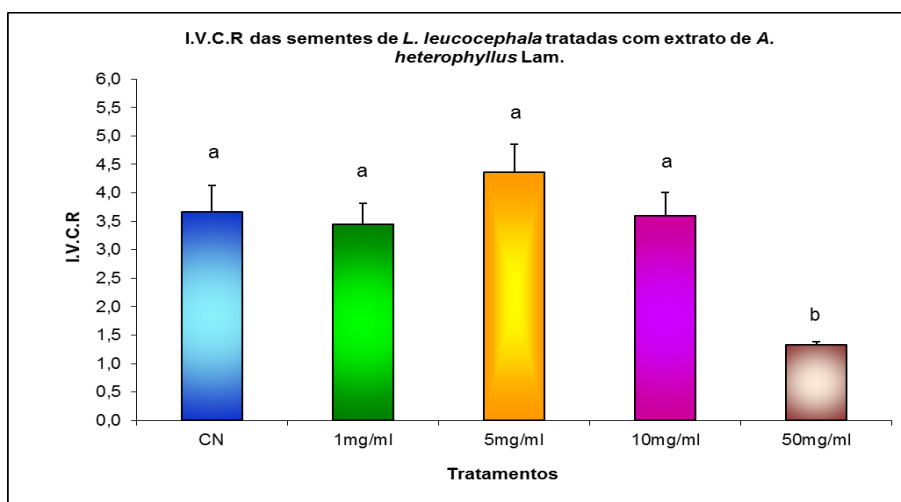
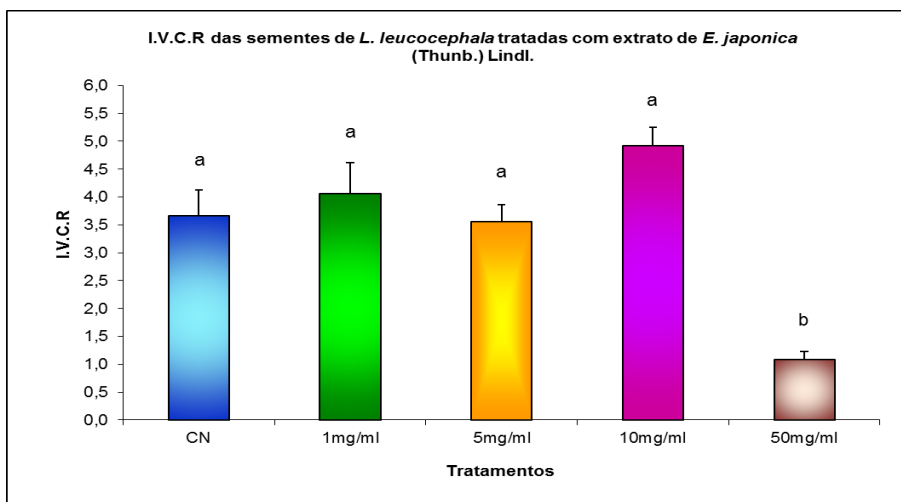
(b)



(c)

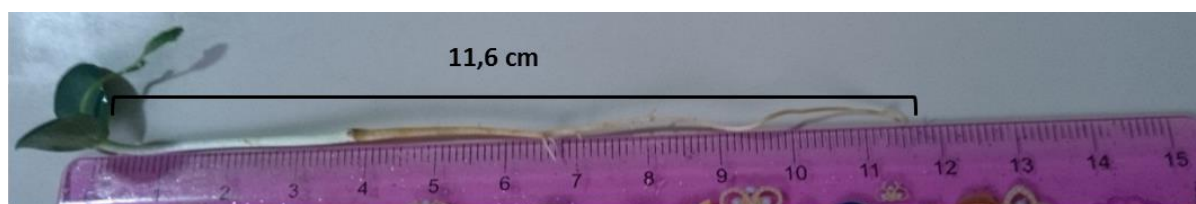


**Figura 33** – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Leucaena leucocephala* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

A figura 34 demonstra a significativa redução ocorrida no comprimento radicular de *L. leucocephala*; além de redução no CRM, ocorreu necrose radicular quando utilizado 50mg/mL do extrato de *A. heterophyllus* Lam, provavelmente efeito da ação dos taninos presentes no extrato, que podem causar apoptose e morte celular, limitando, com isso, a elongação do tecido afetado.

**Figura 34** – Alterações das radículas de *Leucaena leucocephala*, onde: **(a)** - Redução no comprimento radicular quando aplicada a concentração de 50 mg/mL dos extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.; **(b)** – Necrose radicular (em destaque) resultante da exposição à concentração de 50mg/mL do extrato de *A. heterophyllus* Lam.



Semente tratada Controle Negativo



Semente tratada com extrato de *Acacia mangium* Willd à 50mg/mL

(a)



(b)

Se tivesse sido considerada apenas a germinabilidade das sementes de *L. leucocephala* para investigar a existência de ação alelopática dos extratos avaliados, tender-se-ia a concluir que não houve efeito alelopático negativo sobre esta espécie invasora; todavia, fica evidente que - embora as sementes tenham superado a barreira da germinação - as radículas resultantes do tratamento com a concentração máxima dos extratos foram afetadas em seu desenvolvimento inicial; provavelmente, as modificações observadas comprometeriam a funcionalidade das raízes caso o tratamento tivesse se estendido, o que reduziria a viabilidade das plântulas. Isso corrobora a tese de autores como Ferreira e Borghetti (2004) e Maraschin-Silva e Áquila (2006) de que a germinação é a fase menos sensível aos efeitos dos metabólitos secundários e reforça a importância em se analisar aspectos que ultrapassem a germinação a fim de se aferir mais corretamente sobre a alelopatia.

Teste com o extrato foliar de *Acacia pennatula* Benth não influenciou a germinação dos organismos-teste, mas reduziu consideravelmente o desenvolvimento das raízes devido à modificação da alocação de biomassa, além de diminuir em até 30% a sobrevivência destas espécies quando plantadas sobre seu dossel (PEGUERO et al., 2012).

Diversos são os estudos que investigam a ação da *L. leucocephala* sobre outras plantas, como Mauli e outros (2009), e Rosa e outros (2007), para citar alguns; entretanto, não há informações sobre o uso dessa espécie como sistema-teste, o que demonstra mais uma lacuna no concernente ao estudo das espécies invasoras.

#### **5.4.4 Ensaio com *Urochloa brizantha***

A tabela 8 apresenta os valores de índices de germinação e de alelopatia obtidos para as sementes de *Urochloa brizantha*. Quando submetidas ao tratamento com o extrato de *A. mangium* Willd, a capacidade germinativa das sementes foi significativamente reduzida nas concentrações de 1 e 50 mg/mL; por sua vez, todas as concentrações dos extratos de *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl alteraram significativamente a porcentagem de germinação, chegando próximo a zero na concentração máxima testada.

Em detrimento dos resultados com o IG, valores acima de 50% para o IA foram atingidos apenas na maior concentração dos extratos vegetais testados,

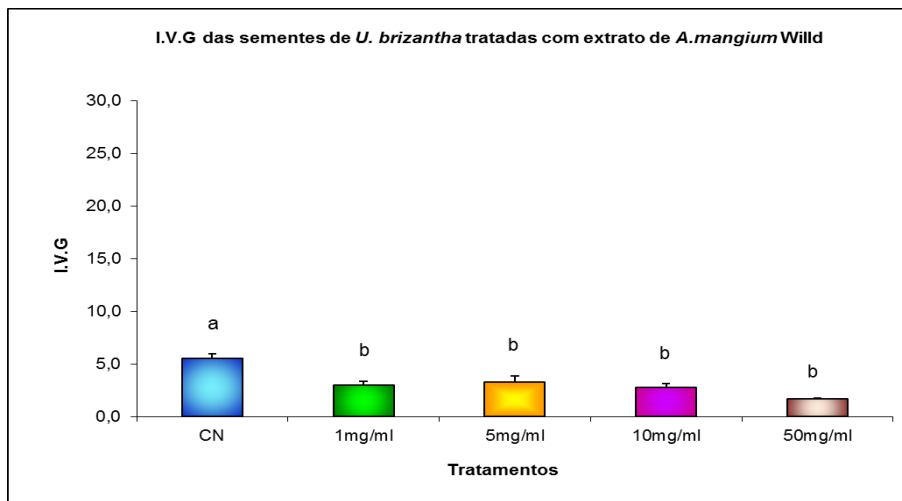
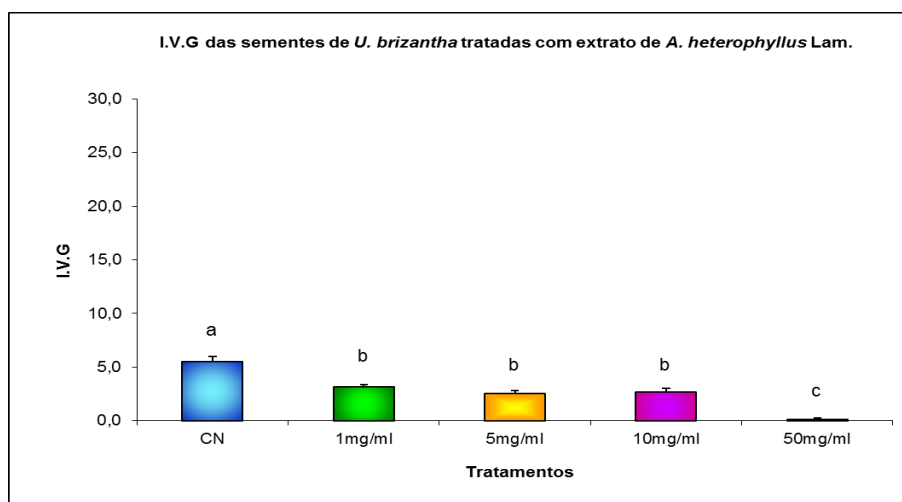
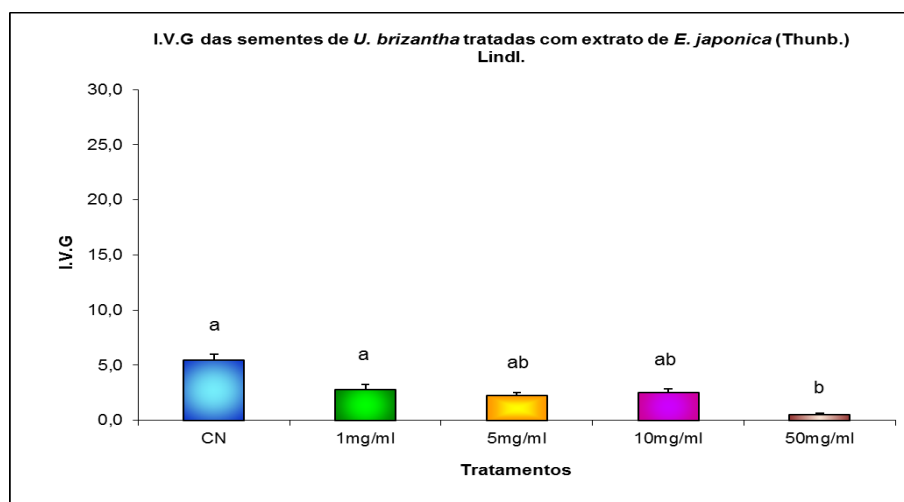
demonstrando mais uma vez que este parâmetro isolado não reflete corretamente os efeitos observados; cabe ressaltar que o IA é apenas uma medida do grau de alelopatia exercido pela substância testada e valores abaixo do considerado como significativos por Balsalobre e outros (2006) em hipótese alguma podem ser interpretados como ausência de efeitos alelopáticos, devendo ser avaliado em conjunto com outros parâmetros.

**Tabela 8.** Índices de Germinação (IG) e de Alelopatia (IA) para as sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL dos extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Sementes germinadas	IG (%)	IA (%)
CN	-	60	66,66 a	-
<i>A. mangium</i> Willd	1	35	38,89 b	41,66
	5	46	51,11 ab	23,33
	10	40	44,44 ab	33,33
	50	25	27,78 b	58,33
<i>A. heterophyllum</i> Lam	1	37	41,11 b	38,32
	5	33	36,67 b	44,98
	10	34	37,78 b	43,32
	50	4	4,44 c	93,34
<i>E. japonica</i> (Thunb.) Lindl.	1	37	41,11 b	38,33
	5	32	35,56 b	46,66
	10	35	38,89 b	41,66
	50	10	11,11 c	83,33

Em se tratando do IVG, a figura 35 demonstra que este parâmetro foi afetado em todas as concentrações dos extratos de *A. mangium* Willd e *A. heterophyllum* Lam, sem, contudo, ter ocorrido um efeito concentração-dependente. No concernente ao extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., embora tenha ocorrido redução no número de sementes germinadas em todas as concentrações testadas, o IVG só foi reduzido de forma significativa em 50 mg/mL, indicando que, nas demais concentrações, as sementes que conseguiram germinar o fizeram em velocidade similar ao tratamento testemunha.

**Figura 35** – Índice de velocidade de Germinação (IVG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

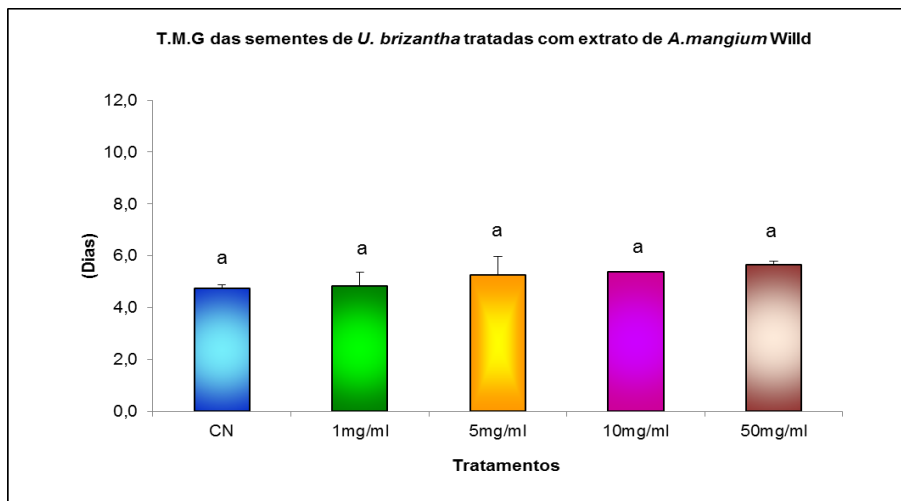
**(a)****(b)****(c)**

Em comparação com *L. leucocephala*, outra invasora, nota-se que *U. brizantha* foi mais sensível aos metabólitos secundários dos extratos do que a primeira, uma vez que já sofreu interferência na capacidade de emissão radicular, demonstrando que cada espécie invasora pode apresentar comportamentos distintos frente aos mesmos fatores.

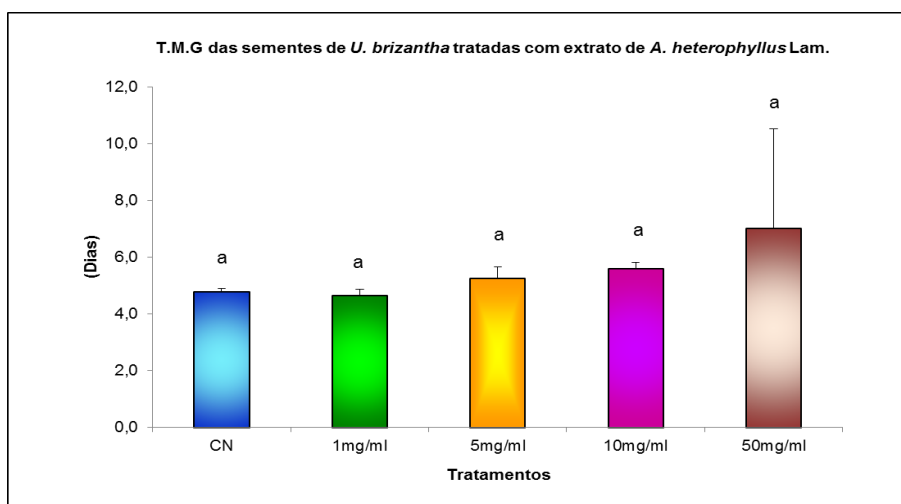
Quanto ao TMG, não houve alteração em nenhuma das concentrações dos três extratos testados; assim, as sementes germinadas levaram, em média, a mesma quantidade de dias para emergir suas radículas do que aquelas submetidas ao controle (figura 36).

Por sua vez, a VMG (figura 37) foi afetada somente na concentração de 50 mg/mL do extrato de *A. heterophyllus* Lam, onde as sementes germinaram mais rápido do que o controle.

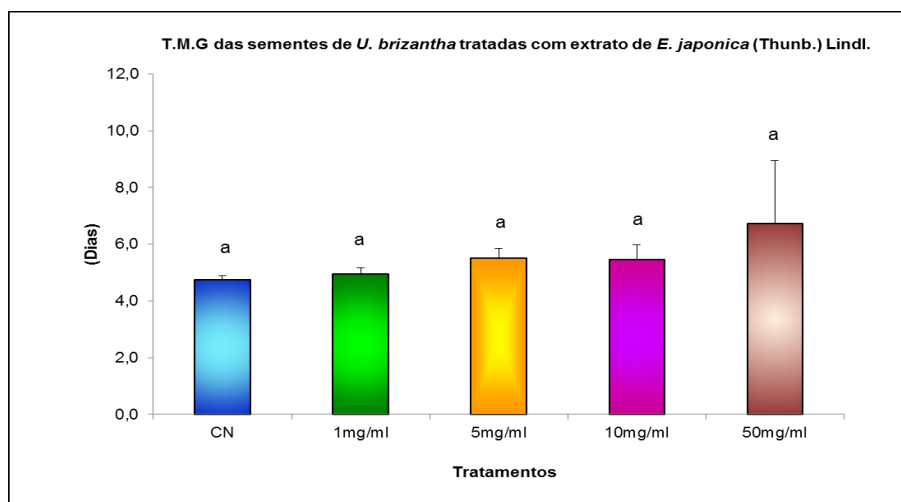
**Figura 36** – Tempo Médio de Germinação (TMG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllus* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



(a)

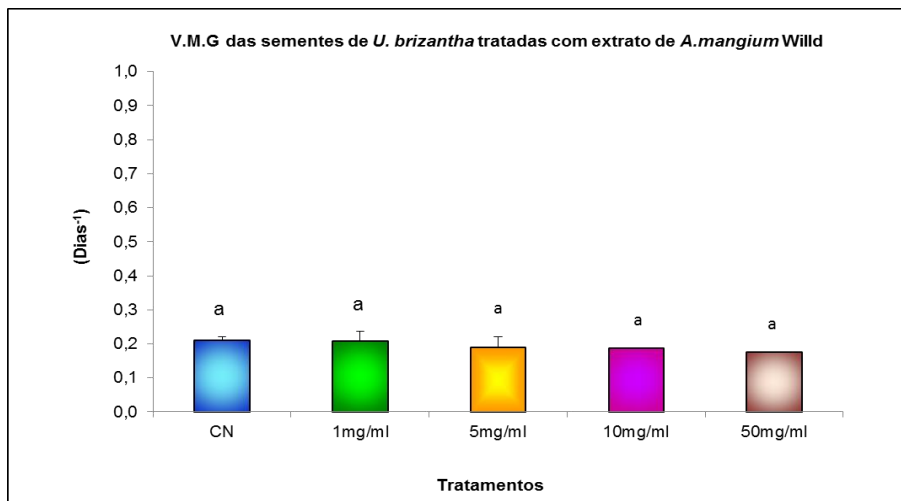


(b)

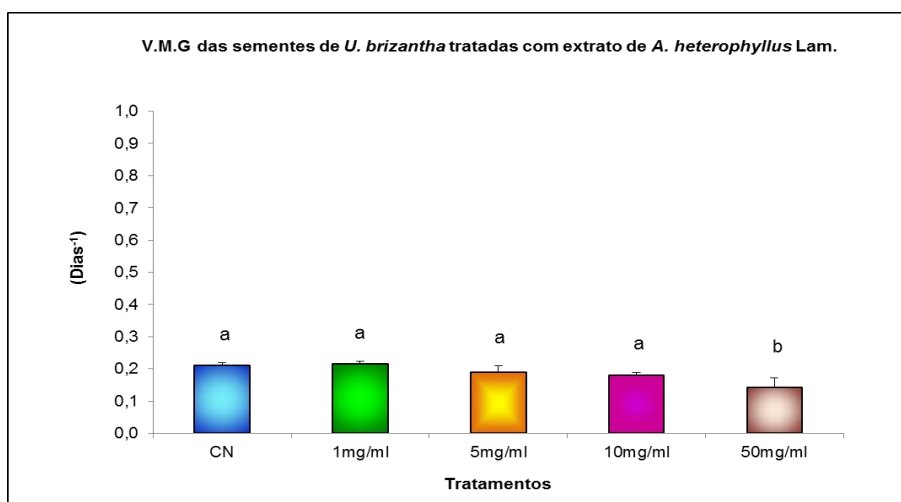


(c)

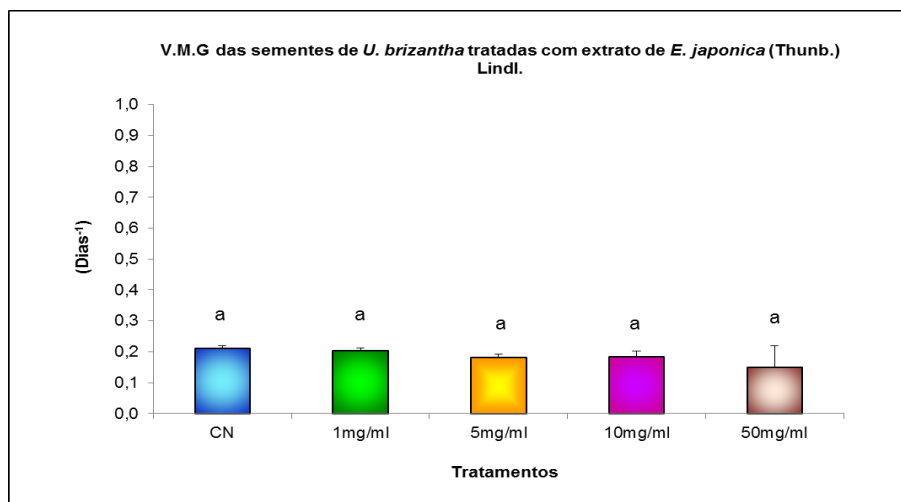
**Figura 37** – Velocidade Média de Germinação (VMG) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**(a)**



**(b)**



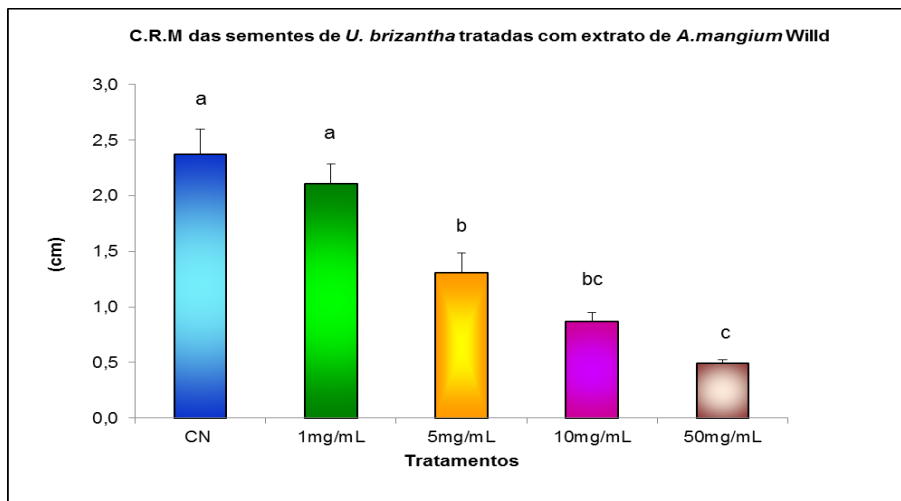
**(c)**



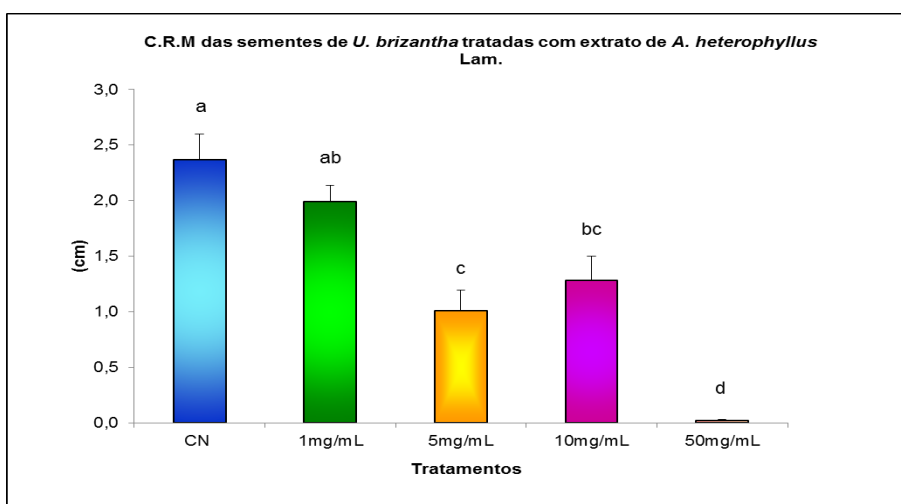
As radículas de *U. brizantha* tiveram seu tamanho reduzido em uma relação concentração-dependente a partir de 5 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd (figura 38). Houve significativa redução, também a partir de 5 mg/mL, quando utilizado o extrato de *A. heterophyllus* Lam, porém sem ter relação direta com o aumento da concentração; o tamanho das radículas chegou próximo a zero quando tratadas com a concentração máxima deste extrato. Quanto ao extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., a queda no tamanho das radículas se deu nos tratamentos com 10 e 50 mg/mL.

Quanto ao IVCR, houve uma redução a partir de 5mg/mL dos extratos de *A. mangium* Willd e *A. heterophyllus* Lam, e em todas as concentrações do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. (figura 39).

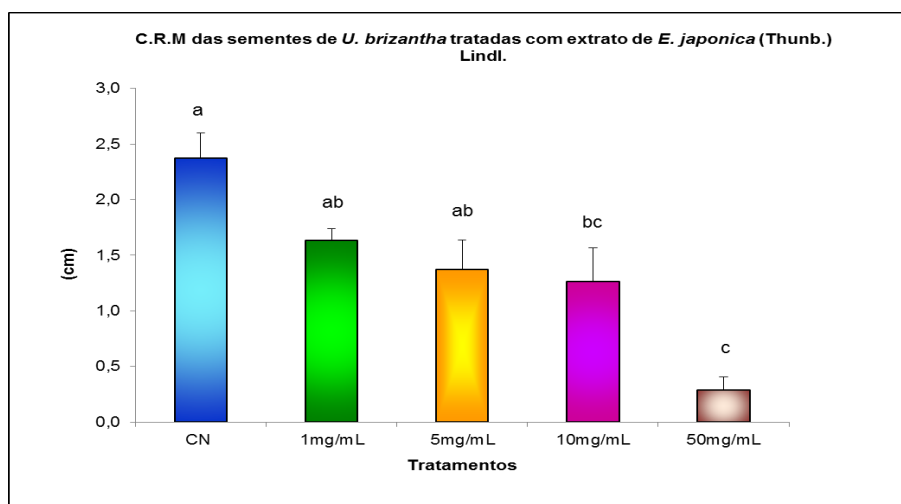
**Figura 38** – Crescimento Radicular Médio (CRM) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



(a)

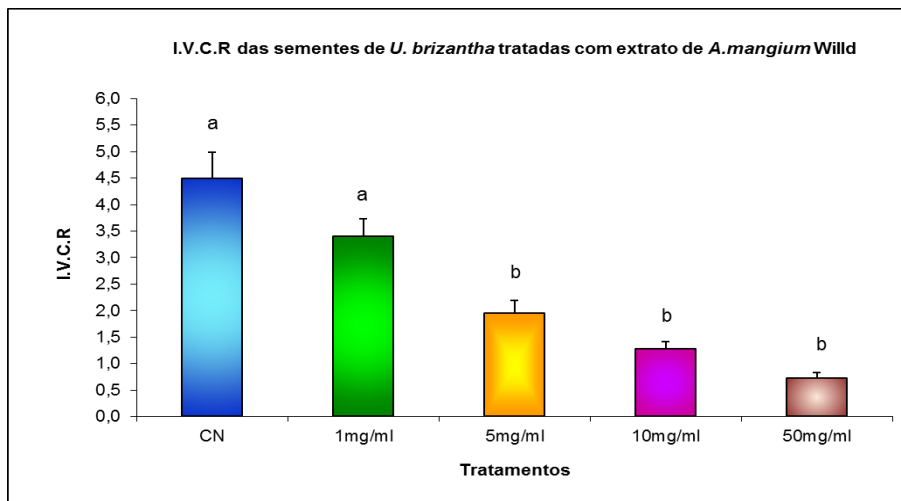
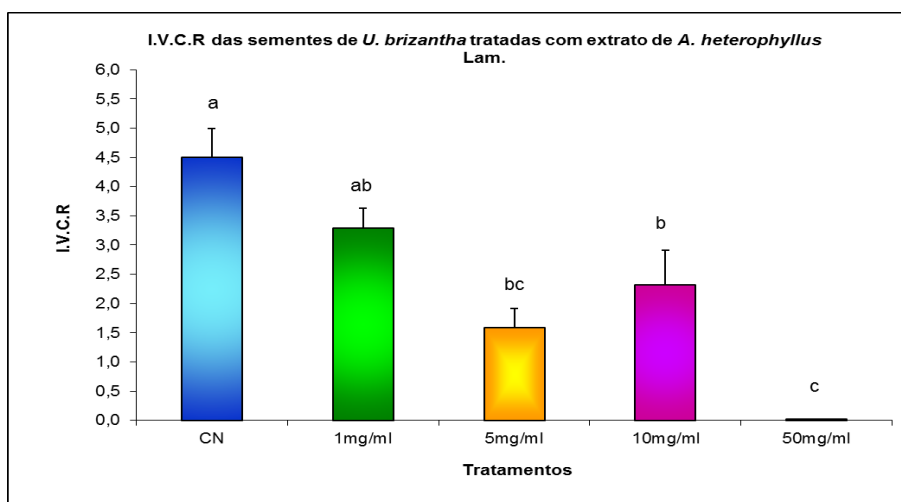
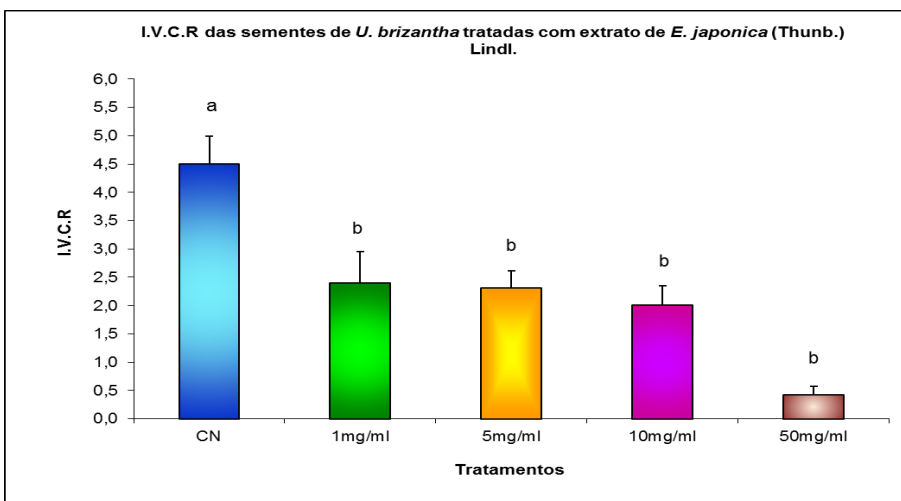


(b)



(c)

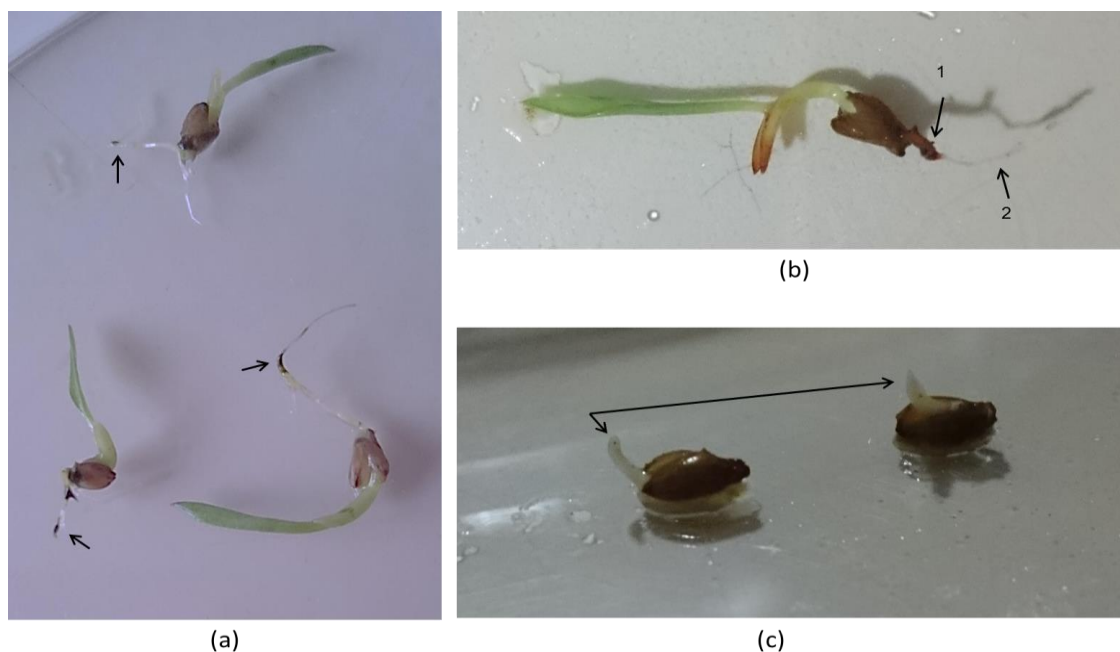
**Figura 39** – Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) das sementes de *Urochloa brizantha* submetidas ao tratamento com o controle negativo (CN) e quatro concentrações (1, 5, 10 e 50 mg/mL) dos extratos de **(a)** - *A. mangium* Willd; **(b)** - *A. heterophyllum* Lam; e **(c)** – *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**(a)****(b)****(c)**

Quando se comparam os dados de CRM e IVCR para as sementes tratadas com *E. japonica* (Thumb.) Lindl., nota-se que, embora as concentrações de 1 e 5 mg/mL não tenham influenciado o tamanho radicular, reduziram significativamente a velocidade de expansão das mesmas, reforçando a importância de avaliar diversos aspectos quando se realiza um estudo alelopático, visto que os aleloquímicos podem agir sobre alguns parâmetros e não ter efeito em outros.

Os efeitos negativos do extrato de *A. mangium* Willd a partir de 5 mg/mL ficaram visíveis quando da observação das radículas de *U. brizantha*, que se tornaram extremamente finas e frágeis, apresentando pontos necróticos (figura 40). Além disso, em todos os extratos testados houve um aumento na ocorrência de sementes que conseguiram iniciar a emissão do broto foliar, mas não obtiveram sucesso na expansão das radículas.

**Figura 40** – Alterações das radículas de *Urochloa brizantha*, onde: **(a)** – radículas com pontos necróticos (em destaque); **(b)** – radícula apresentando necrose (1) e pouca espessura (2); e **(c)** – sementes apresentando emissão de broto foliar (em destaque) e ausência de radícula.



Fonte: Acervo do autor

As anomalias registradas nas radículas de *A. cepa*, *L. leucocephala* e *U. brizantha*, como escurecimento, fragilidade e redução na espessura, resultam, conforme Yamagushi, Gusman e Vestena (2011), da ação de substâncias tóxicas presentes nos extratos sobre o meristema radicular, podendo induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e levar à morte tecidual.

Carvalho e outros (2015) observaram a ocorrência de efeito alelopático do extrato foliar aquoso de eucalipto sobre germinação e crescimento de sementes de outra espécie do gênero *Urochloa* (*U. decumbens*), principalmente nas maiores concentrações testadas. Em estudo com sementes de outras gramíneas, Ferreira, Medeiros e Soares (2008) também relataram efeitos alelopáticos ao trata-las com *Eragrostis plana* Nees, porém em intensidade variável conforme a espécie testada.

A alelopatia, mecanismo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal afetam a germinação e o desenvolvimento de outras plantas (SOARES, apud SARTOR et al., 2009), é característica de muitos vegetais; todavia, dados para espécies invasoras ainda são escassos ou superficiais, o que prejudica o entendimento dos mecanismos lançados por elas para obterem sucesso na invasão.

O estudo de Lorenzo e outros (2011) é uma das poucas exceções ao fato, ao reportarem o envolvimento de mecanismos alelopáticos de *Acacia dealbata* Link sobre eficiência fotossintética e taxa respiratória de quatro espécies nativas no nordeste da Espanha. Ademais, o trabalho também demonstra a susceptibilidade variável das espécies aos aleloquímicos, uma vez que algumas plantas testadas foram mais afetadas do que outras; tal fato corrobora os diferentes resultados encontrados no presente trabalho ao se testar o extrato de *A. mangium* Willd em quatro organismos distintos e evidencia a relevância de testes em diferentes espécies e grupos vegetais a fim de se obterem resultados mais confiáveis.

Sartor e colaboradores (2009) testaram os efeitos de diferentes estágios de maturação das acículas de *Pinus taeda*, outra invasora comum no território brasileiro, sobre a germinação e o desenvolvimento das sementes de aveia preta, identificando uma relação direta entre a inibição de sua germinação e do crescimento do epicótilo e o uso do extrato de acículas verdes; todavia, tal efeito não foi evidenciado quando da utilização de acículas em decomposição.

Quando se comparam os resultados da aplicação dos extratos sobre as também invasoras *L. leucocephala* e *U. brizantha*, observa-se que a primeira espécie foi menos sensível aos aleloquímicos do que a segunda, demonstrando que *L. leucocephala* tem maior resistência aos aleloquímicos presentes nos extratos das espécies testadas do que *U. brizantha*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies exóticas invasoras investigadas (*A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb) Lindl.) demonstraram potencial para afetar alelopaticamente a capacidade germinativa e o desenvolvimento inicial de outras espécies vegetais, comprovando ser esta uma das diversas estratégias que lhes conferem vantagens adaptativas para domínio na ocupação de novos ambientes.

Os resultados aqui expostos demonstram indubitavelmente a importância de se estudar profundamente essas espécies, uma vez que as informações referentes aos seus mecanismos de invasão contribuem para o desenvolvimento de ações efetivas ao seu controle e erradicação. Nota-se que os organismos-teste aqui empregados apresentaram variações quanto à susceptibilidade aos extratos; tal fato sinaliza a importância em se avaliar os efeitos de uma substância sobre diferentes espécies, uma vez que a evolução conferiu variabilidade genética aos diferentes grupos de organismos, fazendo com que reajam de forma fisiologicamente distinta às diversas substâncias lançadas no meio.

Em relação aos organismos-teste *L. leucocephala* e *U. brizantha*, duas espécies invasoras, a menor suscetibilidade aos extratos confirma a capacidade de resistência às condições adversas, inerente à todas as invasoras; entretanto, apesar de terem vencido a etapa de germinação sem maiores danos, o desenvolvimento radicular foi comprometido nas maiores concentrações testadas, demonstrando que os extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl têm potencial para atuarem como controle biológico dessas espécies, necessitando de mais estudos na busca das substâncias responsáveis pelos efeitos observados. Ademais, o fato de *L. leucocephala* ter sido afetada em menos parâmetros quando comparada a *U. brizantha* confirma sua alta resistência e explica sua presença em ambientes diversos, bem como o motivo de sua erradicação ser uma tarefa árdua. Esses dados também demonstram a importância em se avaliar um amplo espectro de parâmetros para se inferir corretamente sobre a existência – ou não – de efeitos alelopáticos; se o presente estudo tivesse se restringido apenas ao aspecto germinativo, achar-se-ia que *L. leucocephala* foi completamente imune aos extratos, o que não condiz com a realidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYI, I.A; AJIBADE, O; ODERINDE, R.A. Preliminary Phytochemical Analysis of some Plant Seeds. **Res.J.chem.sci.**, v. 1, n. 3, p. 58-62, 2011.
- ALBUQUERQUE, M. B. et al. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agron. Sustain. Dev.**, n. 31, p. 379–395, 2011.
- ALIZADEH, O. Exploitation of allelopathy in agriculture. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 7, p. 1559-1562, 2011.
- ATTIAS, N; SIQUEIRA, M.F; BERGALLO, H.G. Acácias Australianas no Brasil: Histórico, Formas de Uso e Potencial de Invasão. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: ICMBIO v. 3, n. 2, p. 74-96, 2013.
- BALDI, E; BUCHERELLI, C. The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: Modulation of Arousal and Consolidation. **Nonlinearity Biol Toxicol Med.**, v. 3, p. 9–21, 2005.
- BALIGA et al. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 1800–1811, 2011.
- BALSALOBRE, L. C. et al. Ação alelopática do arilo das sementes de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Dryand. In: **19ª RAIB**, v.68, suplemento 2, 2006. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/283.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/283.PDF)>. Acesso em: 01 dez. 2006.
- BARNES, M.A. **Invasion biology: a very brief history**. 2014. Disponível em: <[www.pierisproject.org/cool-stuff/invasion-biology-a-very-brief-history](http://www.pierisproject.org/cool-stuff/invasion-biology-a-very-brief-history)>. Acesso em 08 dez. 2015.
- Base de dados nacional de espécies exóticas invasoras I3N Brasil, Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental, Florianópolis – SC. Disponível em: <<http://i3n.institutohorus.org.br>>. Acesso em: 16 dez. 2015.
- BIOINVASIONES. Disponível em <<http://bioinvasiones.org>> Acesso em: 16 dez. 2015.
- BIONDI, D; PEDROSA-MACEDO, J.H. Plantas invasoras encontradas na área urbana de Curitiba (PR). **FLORESTA**. Curitiba, v. 38, n. 1, p. 129-144, 2008.
- BLANCO, J. A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling**, n. 209, 2007.
- BORELLA, J. et al. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Bot. Bras.**, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **A Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB**. Brasília: MMA, 2000.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Oitava reunião da conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica – COP 8 – e terceira reunião das partes do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança – MOP 3**. Brasília: MMA, 2006a.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Brasília: MMA, 2006b.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Protocolo de intenções para a implementação no Brasil da aliança brasileira para a extinção zero**. Brasília: MMA, 2006c.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

\_\_\_\_\_. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº 429, de 28 de fevereiro de 2011**. Publicada no DOU nº 43, em 02 mar. 2011. Brasília: CONAMA, 2011a.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza: Lei nº 9.958, de 18 de julho de 2000; Decreto nº 4.340, de 22 de agosto de 2002; Decreto nº 5.746, de 5 de abril de 2006. Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas: Decreto nº 5.758, de 13 de abril de 2006**. Brasília: MMA/SBF, 2011b.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica: Brasil**. Brasília: MMA, 2011c.

\_\_\_\_\_. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 mai 2012. Sessão 1, p. 1.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Plano Estratégico de Biodiversidade 2011-2020**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008\\_dcbio/\\_arquivos/metas\\_aichi\\_147.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_arquivos/metas_aichi_147.pdf)>. Acesso em: 19 dez. 2015a.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONABIO n.º 05, de 21 de outubro de 2009**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/174/\\_arquivos/anexo\\_resoluconabio05\\_estrategia\\_nacional\\_espcies\\_invasoras\\_anexo\\_resoluconabio05\\_174.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_arquivos/anexo_resoluconabio05_estrategia_nacional_espcies_invasoras_anexo_resoluconabio05_174.pdf)>. Acesso em: 26 nov. 2015b

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**. Disponível em: <[www.icmbio.gov.br](http://www.icmbio.gov.br)>. Acesso em: 22 dez. 2015c.

BURGIEL, S.W; MUIR A.A. **Invasive Species, Climate Change and Ecosystem-Based Adaptation: Addressing Multiple Drivers of Global Change**. Washington: GISP, 2010.



CADOTTE, M. W.; MCMAHON, S. M.; FUKAMI, T. **Conceptual ecology and invasions biology: reciprocal approaches to nature**. Kluwer Publishers: London, 2005.

CARRANO-MOREIRA, A.F. **Manejo integrado de pragas florestais: Fundamentos ecológicos, conceitos e táticas de controle**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2014.

CARVALHO, F.P. et al. The allelopathic effect of eucalyptus leaf extract on grass forage seed. **Planta daninha**, v. 33 n. 2, p. 193-201, 2015.

CECCON, E. **Restauración en bosques tropicales: Fundamentos ecológicos, prácticos y sociales**. Colômbia: CRIM-Ediciones Díaz de Santos, 2013.

CHENG, F; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-16, 2015.

COLAUTTI, R.I et al. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? **Ecology letters**. France, v.7, p.721-733. 2004.

CORREIA, G.G.S; MARTINS, S.V. Banco de Sementes do Solo de Floresta Restaurada, Reserva Natural Vale, ES. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 1, p. 79-87, 2015.

CORRÊA, L.R. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. **South African Journal of Botany**, 2008.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2ª ed Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

CUMMINGS, J.A; PARKER, I.M; GILBERT, G.S. Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration. **Plant Ecol**, n. 213, p. 1975–1989, 2012.

DANDELLOT, S. et al. Allelopathic potential of two invasive alien *Ludwigia* spp. **Aquatic Botany**, n.88, 2008.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. 1ª ed. São Paulo: Martin Claret, 2004.

DAVIDSON, J. **A century of homeopaths: their influence on medicine and health**. Springer Science & Business Media, 2014.

DIAS, J. et al. Invasive Alien Plants in Brazil: A Nonrestrictive Revision of Academic Works. **Natureza & Conservação** v.11, n. 1, p. 1-5, 2013.

DUARTE, M.M; THIENEL M.D. ¿Pueden las especies invasoras ser especies amenazadas en su distribución nativa? **Boletín de la Red Latinoamericana para el Estudio de Especies Invasoras**, v. 3, n. 1, 2013, p. 23-26.

ELESBON, A.A.A. et al. **Diagnóstico Científico do Rio Doce**. Colatina: Inova, 2015. 347p.

ESPÍRITO SANTO. Conselho Estadual de Meio Ambiente. Resolução CONSEMA nº 003/2011. **Diário Oficial do Espírito Santo**, Vitória, 17 out. 2011. p.20-21.

\_\_\_\_\_. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Instrução Normativa nº 17 de 06 de dezembro de 2006. **Diário Oficial do Espírito Santo**, Vitória, 8 dez. 2006. p.35-36.

\_\_\_\_\_. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Ortofotomosaico 2014**. Vitória, 2014.

\_\_\_\_\_. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Disponível em: <[www.meioambiente.es.gov.br](http://www.meioambiente.es.gov.br)>. Acesso em: 22 ago 2015.

FABBRO, C.D; PRATI, D. The relative importance of immediate allelopathy and allelopathic legacy in invasive plant species. **Basic and Applied Ecology**, v. 16, p. 28–35, 2015.

FRANCIS, R.A. A new encyclopedia for biological invasions. **Frontiers of biogeography**. California, v. 3, n. 3, p. 95-97. 2011. Disponível em: <<http://escholarship.org/uc/fb>>. Acesso em: 09 dez. 2015.

FERREIRA, A.G; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n.12, 2000.

FERREIRA, A.G; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FERREIRA, N.R; MEDEIROS, R.B; SOARES, G.L.G. Potencial alelopático do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas perenes estivais. **Rev Bras Sementes**, v. 30, n. 2, p. 43-50, 2008.

FONSECA, J.C. et al. Efeito alelopático do extrato etanólico e das frações obtidas das folhas de *Smilax* sp. sobre *Allium cepa* (cebola). **Blucher Biochemistry Proceedings**, v.1, n.1, p. 49-50, 2015. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/biochemistryproceedings/v-jaibqi/0029.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

FOXCROFT, L.C. et al. **Plant Invasions in Protected Areas: Patterns, Problems and Challenges**. Invading Nature – Springer Series in Invasion Ecology 7. Netherlands: Springer, 2013.

GALINDO-LEAL, C; CÂMARA, I.G. **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica — Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005.

GASPAR-OLIVEIRA, C.M. et al. Duração do teste de germinação de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. **Rev Bras Sementes**, v. 30, n. 3, p. 30-38, 2008.

GATTI, A.B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *ocotea odorífera* (VELL) Rohwer**. Dissertação (Pós-Graduação em Ecologia de Recursos Naturais), São Carlos, 2003.

GATTI, A.B; PEREZ, S.C.J.G.A; FERREIRA, A.G. Avaliação da Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de Folhas de Espécies de Cerrado. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 174-176, 2007.

GAZETA ONLINE. Disponível em: <[http://www.gazetaonline.com.br/\\_conteudo/2015/07/noticias/dinheiro/3901946-plantas-exoticas-sao-usadas-para-reflorestar-areas-no-estado.html](http://www.gazetaonline.com.br/_conteudo/2015/07/noticias/dinheiro/3901946-plantas-exoticas-sao-usadas-para-reflorestar-areas-no-estado.html)>. Acesso em: 10 jul. 2015.

GONCALVES, E. ¿Las especies invasoras conservan su nicho climático?: El caso de *Lantana cámara*. **Boletín de la Red Latinoamericana para el Estudio de Especies Invasoras**, v. 4, n. 1, p. 49-52, 2014.

GOULAS, V. et al. Phytochemical content, antioxidants and cell wall metabolism of two loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars under different storage regimes. **Food Chemistry**, v. 155, p. 227–234, 2014.

GRISI, P.U. et al. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of young leaves of *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 27, n. 1, p. 62-70, 2013.

GUPTA, D. et al. Phytochemical, nutritional and antioxidant activity evaluation of seeds of jackfruit (*Artocarpous heterophyllus* Lam.). **Int J Pharm. Bio. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 336-345, 2011.

HE, H.B. et al. Separation of allelopathy from resource competition using rice/barnyardgrass mixed-cultures. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 1-5, 2012. Disponível em : <[www.plosone.org](http://www.plosone.org)>. Acesso em : 07 jan. 2016.

HERNANDEZ, J. USDA-NRCS PLANTS Database. Disponível em: <[http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=URBR2&photoID=brbr\\_002\\_ahp.tif](http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=URBR2&photoID=brbr_002_ahp.tif)>. Acesso em: 17 jan. 2016.

HIERRO, J.L; CALLAWAY, R.M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, n. 256, p. 29–39, 2003.

HOROWITZ, C; MARTINS, C.R; WALTER, B.M.T. Flora Exótica no Parque Nacional de Brasília: Levantamento e Classificação das Espécies. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: ICMBIO v. 3, n. 2, p. 50-73, 2013.

IBF. Instituto Brasileiro de Florestas. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

INDERJIT, et al. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, n. 12, p. 655-662, 2011.

INSTITUTO HORUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Disponível em <[www.institutohorus.org.br](http://www.institutohorus.org.br)>. Acesso em: 16 dez. 2015.

IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/acacia.mangium.asp>>. Acesso em: 23 abr. 2013.

IPEMA. Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica. **Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura Florestal e unidades de conservação.** IPEMA: Vitória, 2005.

ITO, H. et al. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and Their Cytotoxicity against Human Oral Tumor Cell Lines. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 48, n. 5, p. 687-693, 2000.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. Disponível em <<http://www.iucn.org>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, v. 72, p. 57-65, 2015.

JOHNSTON, E.L; PIOLA, R.F; CLARK, G.F. **The role of propagule pressure in invasion success.** Biological Invasions in Marine Ecosystems. Springer, p 132-151, 2009.

KAUR, R. et al. Community Impacts of *Prosopis juliflora* Invasion: Biogeographic and Congeneric Comparisons. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

KOIKE, F. et al. **Assessment and control of biological invasion risks.** Switzerland: IUCN, 2006.

KRISNAWATI, H; KALLIO, M; KANNINEN, M. *Acacia mangium* Willd.: Ecology, silviculture and productivity. Bogor: CIFOR, 2011.

LACERDA, M.J.R et al. Superação da dormência de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. “Marandu”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 823-828, 2010.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** São Carlos: Rima Editora, 2006.

LEÃO, T.C.C et al. **Espécies exóticas invasoras no nordeste do Brasil: Contextualização manejo e políticas públicas.** Recife: Cepan, 2011.

LI, Z-H. et al. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LIMA, A. de A. et al. Manejo de plantas infestantes na cultura do maracujá amarelo. Cruz das Almas. **Embrapa**, ago., 2004. Disponível em <[http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/circulares/circular\\_70.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/circulares/circular_70.pdf)>. Acesso em 01 dez. 2006.

LORENZO, P. et al. Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata* Link on the physiological parameters of native understory species. **Plant Ecol**, v. 212, p. 403-412, 2011.

LORENZO, P; GONZÁLES, L. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. **Ecosistemas**, v. 19, n. 1, p. 79-91, 2010.

LOWE S. et al. **100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database.** Hollands Printing Ltd:New

Zeland, 2004. Disponível em: <[www.issg.org/bookletS.pdf](http://www.issg.org/bookletS.pdf)>. Acesso em: 20 mai 2015.

LUCENA, M. F. **A. Flora do Engenho Água Azul, Timbaúba, Pernambuco, Brasil.** Relatório Técnico. Recife: CEPAN. 2009.

MAIRESSE, L. A. S. et al. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.2, 2007.

MARASCHIN-SILVA, F.; ÁQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.4, jul./ago. 2006.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. - RJ: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MATHIAS, C. et al. Allelopathic effect of a native species on a major plant invader in Europe. **Sci Nat**, n. 102, 2015.

MATOS, D.M.S; PIVELLO, V.R. O impacto das plantas invasoras nos recursos naturais de ambientes terrestres – alguns casos brasileiros. **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 61 n.1, p 27-30, 2009.

MATTHEWS, S. **América do Sul invadida: a crescente ameaça das espécies exóticas invasoras**. 1ª ed. Programa Global de Espécies Invasoras – GISP, 2005.

MAULI, M. M. et al. Alelopatia de Leucena sobre soja e plantas invasoras. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 55-62, 2009.

McGEOCH, M.A; CHOWN, S.L; KALWIJ, J.M. A Global Indicator for Biological Invasion. **Conservation Biology**, v. 20, n. 6, p 1635–1646, 2006.

McNEELY, J.A. The Great Reshuffling: Human Dimensions of Invasive Alien Species. UK: IUCN, 2001.

McNEELY, J.A, et al. **A Global Strategy on Invasive Alien Species**. Cambridge: IUCN, 2001.

MEINERS, S.J. et al. Developing an ecological context for allelopathy. **Plant Ecol**, n. 213, p. 1221–1227, 2012.

MEINERS, S.J; KONG, C-H. Introduction to the special issue on allelopathy. **Plant Ecol**, n. 213, p. 1857–1859, 2012.

MELHORANÇA FILHO, A.L. et al. Avaliação do potencial alelopático de capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) sobre o desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.). **Ensaios e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 2, p. 21-30, 2012.

MORAES, L.P.S et al. Efeitos alelopáticos de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne sobre *Sesamum indicum* L. e sobre o crescimento de coleótilos de *Triticum aestivum* L. **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 69, n. 1, p. 37-48, 2014.

MORO, M.F. et al. Alienígenas na sala: o que fazer com espécies exóticas em trabalhos de taxonomia, florística e fitossociologia? **Acta Bot. Bras.**, v. 26, n. 4, p. 991-999, 2012.

MURREL, C. et al. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 1, p. 38-43, 2011.

OLIVEIRA, A.B. Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.), var. K-72. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 166-172, 2008.

OLIVEIRA, A.E.S; MACHADO, C.J.S. A experiência brasileira diante das espécies exóticas invasoras e a perspectiva de formulação de uma política pública nacional. **Cienc. Cult.** São Paulo, v.61 n.1, p. 23-26, 2009.

PEGUERO, G. et al. Allelopathic potential of the neotropical dry-forest tree *Acacia pennatula* Benth.: inhibition of seedling establishment exceeds facilitation under tree canopies. **Plant Ecol**, v. 213, p. 1945-1953, 2012.

PELLISSIER, F. Improved germination bioassays for allelopathy research. **Acta Physiol Plant**, n. 35, p. 23–30, 2013.

PERDOMO, M; MAGALHÃES, L.M.S. Ação alelopática da jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*) em laboratório. **Floresta e Ambiente**, v.14, n.1, p. 52-55, 2007.

PERIOTO, F. **Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth. E de *Anacardium humile* Mart. Na germinação e no crescimento de *L. sativa* L. e de *R. sativus* L.** Dissertação (Mestrado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

PETENON, V.; PIVELLO, V.R. Plantas invasoras: representatividade da pesquisa dos países tropicais no contexto mundial. **Natureza e Conservação**, v.6, n. 1, pp. 65-77, 2008.

PYSEK, P.; JAROSIK, V.; PERGL, J. Alien Plants Introduced by Different Pathways Differ in Invasion Success: Unintentional Introductions as a Threat to Natural Areas. **Plos One**, v. 6, n. 9, 2011.

RANAL, M.A et al. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. **Revista Brasil. Bot.**, v.32, n.4, p.849-855, 2009.

RASHER, D.B ; HAY, M.E. Competition induces allelopathy but suppresses growth and anti-herbivore defence in a chemically rich seaweed. **Proc. R. Soc. B**, n. 281, p. 1-9, 2014. Disponível em : <<http://rspb.royalsocietypublishing.org>>. Acesso em 07 jan. 2016.

REICHARD, S.H; WHITE, P.S. Invasion biology: an emerging field of study. **Ann. Missouri Bot. Gard. North Carolina**, v.90, p. 64-66, 2003.

REIGOSA, M et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Bot. Bras.**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

REYNOLDS, A.R. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. **Dose-Response**, v. 8, p. 253–284, 2010.

REZENDE, G.A.A; TERRONES, M.G.H; REZENDE, D.M.L.C. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi). **Biosci. J.**, v. 27, n. 3, p. 460-472, 2011.

RICHARDSON, D.M et al. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. **Diversity Distrib.** EUA, v. 6, n. 2, p. 93-107, 2000.

RIZVI, S. J. **Allelopathy: basic and applied aspects**. Springer Science & Business Media, 2012.

RODRIGUES, A.P.D'A.C. et al. Alelopatia de duas espécies de braquiária em sementes de três espécies de estilóides. **Cienc. Rural**, v. 42, n. 10, p.1758-1763, 2012.

RODRIGUES, E. **Ecologia da restauração**. Londrina: Ed. Planta, 2013.

ROSA, D.M. et al. Potencial alelopático de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit sobre a germinação de sementes de plantas invasoras e soja. **R. bras. Bioci.**, v.5, supl. 2, p.525-527, 2007.

SAMPAIO, A.B; SCHMIDT, I.B. Espécies Exóticas Invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: ICMBIO v. 3, n. 2, p. 32-49, 2013.

SANDVIK, H. et al. Generic ecological impact assessments of alien species in Norway: a semi-quantitative set of criteria. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, p. 37-62, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10531-012-0394-z>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

SANTANA, O.A; ENCINAS, J.I. Levantamento das espécies exóticas arbóreas e seu impacto nas espécies nativas em áreas adjacentes a depósitos de resíduos domiciliares. **Biotemas**, v. 21, n. 4, p 29-38, 2008.

SANTANA, D.G ; RANAL, M.A. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília :Editora UNB, 2004.

SARTOR, L.R. et al. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Cienc. Rural**, v.39, n.6, p. 1653-1659, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000600004>>. Acesso em: 07 mar. 2016.

SAX, D.F; STACHOWICZ, J.J; GAINES, S.D. **Species invasions: Insights into ecology, evolution and biogeography**. Sinauer Associates Inc. 2005.

SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. **Review of the efficiency and efficacy of existing legal instruments applicable to invasive alien species**. Montreal: SCBD, 2001.

SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. **Panorama da Biodiversidade Global 3**. Montreal: SCBD, 2010.

SER. Society for Ecological Restoration, 2015. Disponível em: <<http://www.ser.org/home>>. Acesso em: 09 dez. 2015.

SHINE, C; WILLIAMS, N; GÜNDLING, L. **Guía para la elaboración de marcos jurídicos e institucionales relativos a las especies exóticas invasoras**. UICN Serie de Política y Derecho Ambiental – N°40. Reino Unido: UICN, 2000.

SILVEIRA, P.F; MAIA, S.S.S; COELHO, M.F.B. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2012.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SMITH, A.L; BAZELY, D.R; YAN, N.D. Missing the Boat on Invasive Alien Species: A Review of Post-Secondary Curricula in Canada. **Canadian Journal of Higher Education**. Canadá, v. 41, n. 1, p 34–47, 2011.

SISINNO, C.L.S; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2013-2014**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

SOUZA, J. R. P. de et al. Ação de extratos aquoso e etanólico de espécies vegetais na germinação de sementes de *Brachiaria decumbens* Stapf. **Revista Semina**, Londrina, v. 23, n.2, terceiro trimestre, 2002. Disponível em: <[http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina\\_23\\_2.pdf](http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_23_2.pdf)>. Acesso em: 02 dez. 2006.

STEIN, V. et al. **Germinação e índice mitótico de sementes tratadas com extrato de *Plantago australis* Lam.** 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

TAVEIRA, L.K.P.D; SILVA, M.A.P; LOIOLA, M.I.B. Allelopathy in five species of *Erythroxylum*. **Acta Sci. Agron.**, v. 35, n. 3, p. 325-331, 2013.

TELES, M.M et al. Métodos para Quebra da Dormência em Sementes de Leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 2, p. 387-391, 2000.

TEIXEIRA, I. R. et al. Consórcio de Hortaliças. **Revista Semina**, Londrina, v. 26, n.4, quarto trimestre, 2005. Disponível em: <[http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina\\_26\\_4\\_19\\_10.pdf](http://www.uel.br/proppg/semina/pdf/semina_26_4_19_10.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2006.

THE NATURE CONSERVANCY. **Contextualização sobre espécies exóticas invasoras: Dossiê Pernambuco**. Recife: Cepan, 2009, 65p.



TIMOTHY, O. et al. Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 71–74, 2014.

UESUGI, A; KESSLER, A. Herbivore exclusion drives the evolution of plant competitiveness via increased allelopathy. **New Phytologist**, n. 198, p. 916–924, 2013. Disponível em: <[www.newphytologist.com](http://www.newphytologist.com)>. Acesso em: 08 jan. 2016.

UICN; WWF-BRASIL; IPÊ. **Metas de Aichi: Situação atual no Brasil**. Brasília: UICN, WWF-Brasi e IPÊ, 2011.

VALLE, C.B. **Brachiaria e/ou Urochloa: dando nomes às plantas**. c2010. Disponível em:< [www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias](http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias)>. Acesso em: 03 dez. 2015.

VITULE, J.R.S; PRODOCIMO, V. Introdução de espécies não nativas e invasões biológicas. **Estud. Biol., Ambiente Divers.**, v. 34, n. 83, 2012, p 225-237.

YAMAGUSHI, Q.M.; GUSMAN, S.G.; VESTENA, S. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill., e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. **Ciências Agrárias**, v. 4, p. 1361-1374, 2011.

ZENG, R.S. Allelopathy - The Solution is Indirect. **J Chem Ecol**, n. 40, p. 515–516, 2014.

ZENNI, R.D; ZILLER, S.R. Na overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, 2011, v.34, n.3, p.431-446.

ZILLER, S.R. Os processos de degradação ambiental originados por plantas exóticas invasoras. **Revista Ciência Hoje, Coluna Opinião**, v. 30, n. 178, Dezembro de 2001. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/revista-ch-2001/178>>. Acesso em: 12 out. 2014.

ZILLER, S.R; DECHOUM, M.S. Plantas e Vertebrados Exóticos Invasores em Unidades de Conservação no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: ICMBIO v. 3, n. 2, p. 04-31, 2013.

## **CAPÍTULO 2**

### **Avaliação do potencial mutagênico dos extratos foliares de três espécies invasoras por meio do bioensaio *Allium cepa*.**

Autor: Schirley Costalonga<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

\* Autor para correspondência: [schirleycostalonga@uol.com.br](mailto:schirleycostalonga@uol.com.br)

## RESUMO

A invasão biológica é uma das principais causas de perda de biodiversidade e dificulta ações de proteção e recuperação dos ecossistemas. Poucos estudos investigam quais os mecanismos de ação utilizados pelas espécies invasoras a fim de obterem sucesso em novos habitats ou se eles envolvem alterações no ciclo celular e danos ao material genético. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito mutagênico dos extratos etanólicos de folhas de três espécies invasoras (*Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam e *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl) sobre as sementes de *A. cepa*. Estas foram submetidas aos tratamentos contínuo e descontínuo (agudo e crônico) em meio contendo água (controle negativo), o herbicida trifluralina (controle positivo) ou quatro concentrações dos extratos (1, 5, 10 e 50 mg/mL). O índice mitótico foi afetado em todas as concentrações de ambos os tratamentos (contínuo e descontínuo) quando utilizado o extrato de *A. mangium* Willd, bem como em todas as concentrações dos tratamentos descontínuos e 1, 5 e 10 mg/mL do tratamento contínuo com o extrato de *A. heterophyllus* Lam, uma vez que a concentração de 50 mg/mL não germinou; em relação ao extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl, a mesma redução foi observada, porém não foi possível analisar a concentração de 50 mg/mL do tratamento descontínuo crônico, uma vez que as sementes apresentaram crescimento anormal e não responderam à coloração. Alterações significativas no índice de efeito aneugênico e no índice de aberração não foram registradas, o que pode ser devido à escassez de células em divisão. Por sua vez, o extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl induziu efeitos clastogênico em 1, 5 e 10 mg/mL do tratamento contínuo, 5 e 10 mg/mL no tratamento descontínuo agudo e 10 mg/mL no tratamento descontínuo crônico; em *A. heterophyllus* Lam, tal efeito foi manifestado quando as sementes foram tratadas com 10mg/mL do tratamento contínuo e em 1, 10 e 50mg/mL do tratamento descontínuo agudo. *A. mangium* Willd foi citotóxica, pois não causou aneugenicidade ou clastogenicidade; já *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl foram genotóxica. Esses resultados demonstram que estas espécies invasoras podem causar modificações no ciclo celular, obtendo vantagens na ocupação de novos territórios.

**Palavras-chave:** *A. mangium* Willd. *A. heterophyllus* Lam. Ciclo celular. *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Mutagenicidade. Sistema-teste *A. cepa*.

## ABSTRACT

Biological invasion is currently one of the main causes of biodiversity loss and difficult protection and recovery actions of ecosystems. Few studies investigate which are the mechanisms used by alien species that make them successful in new habitats and if they are related with changes in the cell cycle or damages in DNA. Thus, the aim of this study was to evaluate the mutagenic effect of leave extracts of three invasive species, *Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam and *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl over *A. cepa* seeds. They were submitted to continuous and discontinuous (acute and chronic) treatments in medium with water (negative control), the herbicide trifluralin (positive control) or four concentration of each extract (1, 5, 10 and 50 mg/mL). The mitotic index was affected in all concentrations of three extracts tested and in all treatments (continuous and discontinuous) except for 50mg/mL of *A. heterophyllus* Lam in continuous treatment because the seeds could not germinate and 50 mg/mL of *E. japonica* (Thunb.) Lindl that presented abnormal radicles growth and did not reply to coloration. Changes in aberration index and aneugenic effects were not related to any treatment tested, what can be explain because most of the cells being at interphase. In turn, *E. japonica* (Thunb.) Lindl extract induced clastogenic effects in 1, 5 and 10 mg/mL of continuous treatment, 5 and 10 mg/mL in acute discontinuous treatment and 10 mg/mL in chronic discontinuous treatment. As to *A. heterophyllus* Lam clastogenic effect was observed in 10mg/mL of continuous and 1, 10 and 50 mg/ml of acute discontinuous treatments. These results show that changes in a cell cycle can be one of the strategies used by invasive species to overrun new environments. *A. mangium* Willd was cytotoxic because do not change the aneugenic and clastogenic index; *A. heterophyllus* Lam and *E. japonica* (Thunb.) Lindl were genotoxic. These results demonstrate that these alien species can induce modifications in cell cycle and obtain advantages in the occupation of new environments.

**Key words:** *A. cepa* assay. *A. mangium* Willd. *A. heterophyllus* Lam. Cell cycle. *E. japonica* (Thunb.) Lindl. Mutagenicity.

## **1 INTRODUÇÃO**

A evolução propiciou aos seres vivos o desenvolvimento de mecanismos de ataque e defesa que permitem sua sobrevivência no planeta Terra; um dos mais eficazes é a alteração/destruição do material genético, culminando em mudanças fisiológicas e anatômicas graves que, em muitos casos, inviabilizam o desenvolvimento do organismo.

Na natureza, as espécies estão constantemente expostas a diversas substâncias que apresentam a capacidade de interagir com o DNA, afetando os processos genéticos direta ou indiretamente; no caso das plantas, por serem formas de vida sésseis, a evolução lhes permitiu desenvolver diversas classes de metabólitos secundários com funções como a defesa contra predadores e patógenos, dentre outras. Tal fenômeno, conhecido como alelopatia, é amplamente investigado, se restringindo, todavia, aos aspectos visíveis durante o desenvolvimento vegetal (alterações ocorridas no processo de germinação e desenvolvimento). Infelizmente, a grande maioria das pesquisas negligencia por completo o fato de que tais modificações fenotípicas são, geralmente, resultados de profundas mudanças celulares que afetam o ciclo celular e o material genético.

Por todo o globo terrestre, a destruição de espécies nativas por espécies invasoras está se agravando com o avanço da globalização e a consequente quebra das barreiras geográficas; destarte, investigar profundamente todos os aspectos que permitem o sucesso das invasoras na ocupação de novos ambientes é primordial e urgente, uma vez que auxiliará no desenvolvimento de estratégias eficazes para seu controle e erradicação nos ecossistemas invadidos sem, entretanto, impactar as espécies nativas. Além disso, associar os aspectos alelopáticos com a ocorrência de alterações causadas pelos metabólitos secundários sobre o material genético e ciclo celular é importante, pois pode amplificar o entendimento dos mecanismos de invasão utilizados por determinada espécie.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O HISTÓRICO DA GENÉTICA TOXICOLÓGICA

A exposição a agentes potencialmente danosos ao organismo é uma condição inerente aos seres vivos desde o advento da vida no planeta Terra; contudo, o desenvolvimento tecnológico, especialmente a partir da Revolução Industrial, contribuiu exacerbadamente para elevar tanto a quantidade dessas substâncias quanto a possibilidade de exposição (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Segundo Bagatini, Silva e Tedesco, (2007), tais agentes, cuja origem pode ser química, física ou biológica, induzem modificações tanto ao nível celular quanto molecular, afetando processos vitais como a duplicação e transcrição gênica, bem como causando alterações cromossômicas<sup>1</sup>; essas alterações podem aumentar e/ou acelerar o aparecimento de mutações, além de levar à morte celular (CARVALHO, 2004; ALMEIDA NETO et al., 2005; SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013; SILVA et al., 2014).

Desde o antigo Egito já havia registros sobre substâncias que poderiam causar malefícios à saúde humana; na Grécia, Hipócrates, considerado por muitos como o criador da medicina moderna, descreveu instruções detalhadas sobre a ação de vários compostos tóxicos aos seres humanos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A detecção de tais substâncias potencialmente citotóxicas<sup>2</sup> e genotóxicas, bem como a investigação de seus efeitos sobre os organismos, é campo de atuação da Genética Toxicológica, cujos primórdios remontam à Europa do início de 1900. Conforme Wasson e outros (2010), a redescoberta do trabalho de Mendel levou ao rápido desenvolvimento da Genética e com ela o interesse pela forma como fatores externos são capazes de afetar os processos gênicos, selecionados evolutivamente para serem precisos e corrigir suas próprias falhas. Todavia, são os trabalhos de Herman Joseph Muller (1927) e de Auerbach et al. (1947) que são considerados o marco oficial do início da Genética Toxicológica, uma vez que ambos – ao trabalharem com a indução de mutações em células de *Drosophila* sp. - “[...] destacaram o conceito de mutação e empreenderam esforços na análise de como e

---

<sup>1</sup> As substâncias que afetam diretamente o material genético e alteram a replicação e tradução do DNA são conhecidas como genotóxicas (LUIZETTI et al., 2012; SILVA et al., 2014).

<sup>2</sup> Substâncias capazes de provocar danos à célula como um todo, não só ao material genético.

por que agentes (físicos, químicos ou biológicos) induzem mudanças genéticas [...]” (WASSON et al, 2010, tradução nossa).

Ainda no início do século XX, o botânico De Vries, em sua obra “*A teoria da mutação*”, já advertia para a possibilidade de que, ao se aclarar os princípios que levavam à falha nos mecanismos de reparo, poder-se-ia “planejar” mutações a fim de obter características desejáveis. Para ele,

[...] novas espécies ou variedades poderiam se formar em um único passo (com saltos) a partir da espécie parental que continuaria existindo sem modificar-se durante o processo. A essas novas espécies ou variedades ele chamou de “mutantes” (MARTINS; BRITO, 2006).

No decorrer dos trinta primeiros anos do século XX, diversas descobertas na área da Genética e o trabalho de Muller comprovando os efeitos da radiação na mutagênese levantaram questões acerca da indução artificial de mutações, bem como sobre a possibilidade de químicos como álcool, morfina, amônia e diversos metais alterarem o material genético; para Auerbach e colaboradores (apud WASSON et al., 2010)

Se, como desconfiamos, a mutação é um processo químico, então o conhecimento dos reagentes capazes de iniciar esses processos poderá trazer luz a não somente a reação em si, mas também sobre a natureza do gene, outro parceiro na reação (tradução nossa).

Na década de 1950, Barthelmess publicou um artigo sobre as substâncias químicas utilizadas na medicina com efeitos comprovadamente citogenéticos; diversas pesquisas foram ao encontro desse artigo durante os anos 1960 e começou-se a prática de realizar ensaios mutagênicos antes da liberação para venda de qualquer droga.

Muller [foi um dos que] expressou preocupação de que humanos estivessem sendo expostos a um grande número de substâncias (como aditivos alimentares, drogas, narcóticos, antibióticos, pesticidas, cosméticos, contraceptivos, poluentes do ar e da água) não encontradas nas gerações anteriores e para as quais os indivíduos expostos não tinham sido especificamente adaptados pela seleção natural (WASSON et al., 2010, tradução nossa).

A obra de Rachel Carlson intitulada *Primavera Silenciosa*, em 1962, a qual documentava o efeito de agrotóxicos sobre aves deu força ao estudo da Toxicologia Ambiental (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013) e com o lançamento do periódico *Mutation Research*, em 1964, a Mutagênese Ambiental alcançou, de fato, relevância

na comunidade acadêmica, resultando na criação das Sociedades Americana e Europeia de Mutagênese em 1969 e 1970, respectivamente (RIBEIRO et al., 2003).

Em 1970, as pesquisas de Ames e McCann apontaram para fortes semelhanças entre o processo de mutagenicidade em *Salmonella* sp. com a carcinogênese em humanos (MACGREGOR; CASCIANO; MULLER, 2000); segundo Wasson e outros (2010), o teste com *Salmonella* gerou, à época, imenso entusiasmo pela possibilidade de utilizar testes de baixo custo na identificação e controle de exposição de químicos carcinogênicos e até hoje é um dos testes mais empregados na área da Mutagênese Ambiental.

Em 1980, diversos países incluíram a mutagenicidade entre a bateria de testes a serem realizados antes da liberação de novas substâncias no mercado (RIBEIRO et al., 2003). Os avanços ocorridos no final daquele século, como o sequenciamento genômico de seres vivos e novas tecnologias empregadas na ciência, ampliou as possibilidades de pesquisa no campo da mutagênese, tornando-a uma das áreas mais promissoras da genética na atualidade.

## 2.2 O PROCESSO DE DIVISÃO CELULAR E SEUS MECANISMOS DE CONTROLE

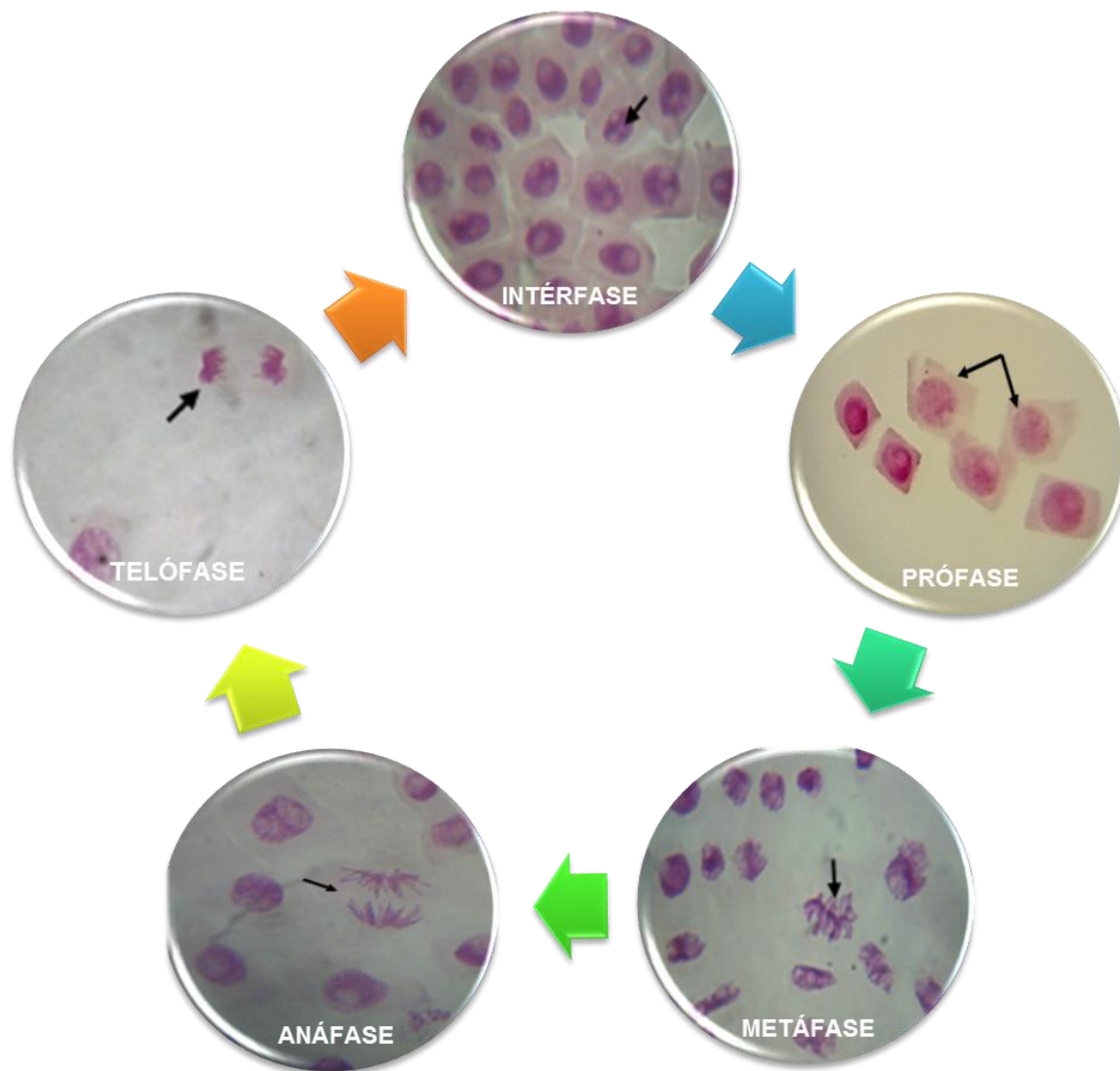
Segundo Alberts e outros (2010, p. 1053), “todos os organismos vivos, da bactéria unicelular ao mamífero multicelular, são produtos de repetidos ciclos de crescimento e divisão celular que remontam aos primórdios da vida na Terra, há mais de três bilhões de anos”. Portanto, o desenvolvimento e manutenção das formas de vida existentes dependem da constante renovação celular, bem como da interação entre os grupos celulares, mediada por proteínas sinalizadoras (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Para isso, as células precisam deixar a fase de repouso, conhecida como interfase, e entrar em processo de divisão a fim de garantir a sustentação da vida (figura 1). Cada etapa do ciclo celular é controlada por genes codificadores de moléculas que atuam no mecanismo de controle, visando garantir a estabilidade e integridade do processo; esses pontos de checagem determinam não só a ordem de ocorrência dos eventos, mas também envolvem os sistemas de reparo que exercem importante



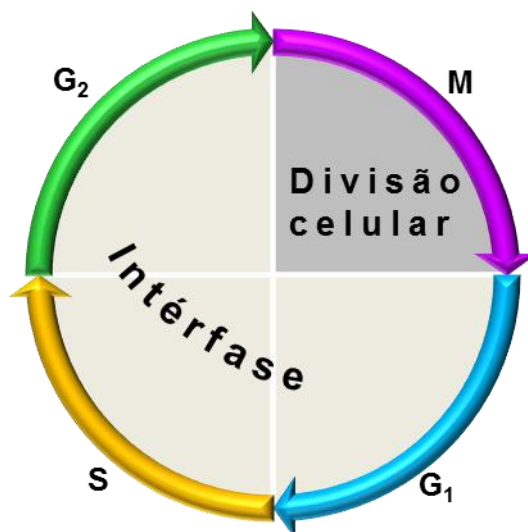
função durante a replicação do material genético (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997).

**Figura 1** – Esquematisação das etapas de um ciclo de divisão celular normal. Aumento: 400X.



O objetivo do ciclo celular mitótico é garantir a produção de nova geração de células contendo o mesmo conjunto gênico das progenitoras (ALBERTS et al., 2010); seus estágios são similares na maioria dos organismos e consiste basicamente de duas partes sequenciais (figura 2): a intérfase, formada pelos estágios G1, S e G2, e o estágio M, onde – por meio da mitose – ocorre a real divisão do material genético (previamente duplicado na fase S da intérfase) e a divisão da célula em duas pela citocinese, cada uma com um núcleo idêntico, (GRIFFITHS et al., 2006; ALBERTS et al., 2010).

**Figura 2** – Representação das quatro fases gerais do ciclo celular, onde a intérfase é caracterizada pelas fases G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>, enquanto a divisão celular de fato ocorre na fase M.



### 2.2.1 Intérfase

Em detrimento ao seu significado (repouso), a intérfase é a etapa em que a célula está mais ativa, visto que é o momento da replicação do material genético; consiste na maior e mais lenta fase do ciclo.

Os intervalos G<sub>1</sub> (fase em que a célula-filha recém-formada na mitose ainda não replicou o DNA para entrar em nova divisão) e G<sub>2</sub> (período no qual a célula já duplicou seu material genético na fase S, mas ainda não iniciou o processo de divisão) são muito mais do que um simples retardo temporal utilizado pela célula para seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013); também permitem que

[...] a célula monitore o ambiente interno e externo a fim de se assegurar de que as condições são adequadas e os preparativos estejam completos, antes que a célula se comprometa com as principais transformações da fase S e da mitose. Nesse sentido, a fase G<sub>1</sub> é especialmente importante. Sua duração pode variar imensamente, dependendo das condições externas e de sinais extracelulares de outras células. Se as condições são desfavoráveis [...], as células retardam a progressão a G<sub>1</sub> e podem entrar em um estado de repouso conhecido como G<sub>0</sub>, no qual podem permanecer por semanas ou mesmo anos antes que a proliferação seja retomada [...]. Se as condições extracelulares são favoráveis e os sinais para crescer e se dividir estão presentes, as células [...] avançam até um ponto de comprometimento próximo ao fim de G<sub>1</sub>, conhecido como ponto de restrição [...]. (ALBERTS, 2010, p. 1055).

Atingido esse ponto, a replicação do material genético é inevitável, mesmo que a sinalização extracelular seja removida.

Cabe ressaltar que, diferentemente das células animais, as dos vegetais possuem a capacidade de parar o ciclo durante as fases G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, fenômeno conhecido como endorredução, podendo, portanto, se submeter a inúmeros ciclos adicionais de replicação nuclear sem entrar em mitose (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A fase S, segundo Griffiths e outros (2006), é essencial para a propagação do genótipo às células descendentes, uma vez que é o momento no qual o DNA de cada cromossomo será replicado de forma semiconservativa.

Para Alberts e outros (2010, p. 1067),

Uma célula deve resolver dois problemas ao iniciar e concluir a replicação do DNA. Primeiro, a replicação deve ocorrer com extrema precisão, a fim de minimizar o risco de mutações na próxima geração de células. Segundo, cada nucleotídeo [...] deve ser copiado somente uma vez, a fim de evitar os efeitos danosos da amplificação gênica.

O processo de replicação inicia-se no início da fase G<sub>1</sub>, com o agrupamento do complexo pré-replicativo nas origens de replicação; no início da fase S, ocorre a formação do complexo pré-iniciação, que desenrola a dupla hélice e transporta a DNA-polimerase e as demais enzimas replicativas até as fitas de DNA (ALBERTS et al., 2010).

Ao final do processo, os cromossomos se dividem de forma longitudinal, gerando - cada um - um par de cromátides irmãs<sup>3</sup> que permanecem unidas graças às proteínas de adesão denominadas Coesinas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

### **2.2.2 Mitose**

Griffiths e outros (2006) definem o processo de mitose como sendo a divisão assexuada das células, cuja finalidade é a reprodução direta do tipo celular, de modo a garantir a manutenção do conjunto de cromossomos ao longo das gerações.

Embora compreenda o menor segmento do ciclo celular (5-10%), envolve profundas modificações na arquitetura celular; sendo que primeiramente, o vacúolo central é dividido por “uma união de correntes transvacuolares citoplasmáticas que contém o núcleo; esta se torna a região onde a divisão ocorrerá” (TAIZ; ZEIGER, 2013, p. 26).

---

<sup>3</sup> Cada cromátide consiste em uma das moléculas de DNA que foram replicadas.

Há um aumento da atividade da enzima M-Cdk que, juntamente com outras Cinases, fosforila uma série de proteínas para a constituição do fuso mitótico<sup>4</sup> e sua ligação aos pares de cromátides-irmãs, desencadeando as fases iniciais do processo (prófase e metáfase); durante a transição de metáfase à anáfase, além da inativação das Cdks<sup>5</sup>, ocorre a ativação da enzima Separase, responsável pela clivagem da Coesina e consequente separação das cromátides-irmãs (GRIFFITHS et al., 2001; ALBERTS et al., 2010).

A mitose pode ser dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase; alguns autores consideram a existência de etapa intermediária entre a prófase e a metáfase, denominada prometáfase, que envolve a desintegração abrupta da carioteca, permitindo o acesso das fibras do fuso mitótico às cromátides.

#### 2.2.2.1 PRÓFASE

Os pares de cromátides-irmãs alteram seu estado organizacional e se condensam até atingirem uma forma mais curta e espessa, facilitando a movimentação durante o ciclo (GRIFFITHS et al., 2001). Conforme Alberts e outros, a condensação é vital, uma vez que, caso isso não ocorresse, qualquer tentativa de separação das cromátides, por menos força que empregasse, causaria sua ruptura; essa mudança na estrutura cromossômica envolve os seguintes processos:

[...] a *condensação dos cromossomos*, na qual as cromátides são dramaticamente compactadas; e a *resolução das cromátides-irmãs*, por meio da qual as duas irmãs são resolvidas em unidades separáveis distintas. A resolução resulta do desencadeamento dos DNAs-irmãos, acompanhado pela remoção parcial de moléculas de coesina ao longo dos braços cromossômicos [...] (ALBERTS et al., 2010, p. 1075).

Cada cromátide se concentra no centrômero, os nucléolos - grandes estruturas intranucleares - desaparecem neste estágio e a membrana nuclear começa a se desfazer. O nucleoplasma e o citoplasma se unem. Externamente ao núcleo, inicia-se a formação do fuso mitótico entre os centrossomos (ALBERTS et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

---

<sup>4</sup> Estrutura bipolar de microtúbulos que se forma na região nuclear e que se direciona a cada um dos dois polos da célula; é fundamental para a segregação dos cromossomos na anáfase (GRIFFITHS et al., 2001; ALBERTS et al., 2010).

<sup>5</sup> Esse é um processo fundamental, pois garante os eventos necessários para o fim da mitose, ou seja, a desmontagem do fuso mitótico e a citocinese (ALBERTS et al., 2010).

#### 2.2.2.2 METÁFASE

O fuso nuclear recém-formado na prófase torna-se proeminente e os cromossomos se alinham no plano equatorial da célula, onde se ligarão aos microtúbulos do fuso de cada polo (GRIFFITHS et al., 2001; ALBERTS et al., 2010).

#### 2.2.2.3 ANÁFASE

Nesta etapa, as cromátides-irmãs se separam e formam dois cromossomos filhos; começa a ocorrer o distanciamento dos polos do fuso simultaneamente ao encurtamento dos microtúbulos, fazendo com que os cromossomos se segreguem em dois grupos iguais nas extremidades opostas da célula (ALBERTS et al., 2010).

#### 2.2.2.4 TELÓFASE

É o último estágio da mitose, onde, com os conjuntos de cromossomos segregados em cada polo do fuso, ocorre a reconstituição da carioteca ao redor de cada núcleo filho (GRIFFITHS et al., 2001); a partir deste momento, “os complexos de poros bombeiam proteínas nucleares para o interior, o núcleo se expande e os cromossomos mitóticos condensados são reorganizados em seu estado interfásico, possibilitando a retomada da transcrição gênica” (ALBERTS et al., 2010, p. 1090). O fuso se dispersa e ocorre o reaparecimento do nucléolo.

#### 2.2.3 Citocinese

Consiste na divisão citoplasmática da célula que terminou o processo de divisão, por meio de um anel contrátil constituído por filamentos de actina e miosina; este irá comprimir a célula ao meio, originando duas células-filhas, cada uma com um núcleo e um conjunto cromossômico (ALBERTS et al., 2010).

Diferentemente das células animais, a citocinese nos vegetais superiores compreende a divisão do citoplasma de dentro para fora devido à construção da nova parede celular entre os dois núcleos-filhos; para isso, o plano de divisão é estabelecido antes da fase M e deverá – ainda – propiciar o estabelecimento da placa celular (precursora da nova parede celular) ao final da anáfase (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A formação da placa celular é orientada pelo fragmoplasto<sup>6</sup>, por meio do qual serão transportadas para o centro da célula pequenas vesículas do aparelho de Golgi contendo os polissacarídeos e proteínas que constituirão a parede celular; ao chegarem ao equador da célula, essas vesículas se fundem e formam uma estrutura discoidal envolta por membrana, denominada placa celular inicial, que se expande à medida que mais vesículas se fundem umas às outras, até alcançar a membrana plasmática e a parede celular original, fundindo-se com elas e dividindo a célula em duas (ALBERTS et al., 2010, TAIZ; ZEIGER, 2013).

À medida que a placa celular se forma, ocorre a agregação de túbulos do [retículo endoplasmático] em canais revestidos de membrana que atravessam a placa, conectando as células filhas e estabelecendo os locais dos plasmodesmas<sup>7</sup> primários. [...] A distribuição do Complexo de Golgi e de outras organelas ocorre igualmente entre as duas metades da célula. O sistema de endomembranas e o citoesqueleto são amplamente rearranjados (TAIZ; ZEIGER, 2013, p. 26).

Substâncias com potencial citotóxico, dentre elas metabólitos secundários, podem interferir nas etapas de divisão impedindo seu início e, conseqüentemente cessando o crescimento do organismo, ou ainda, afetar o funcionamento do fuso mitótico, gerando anomalias nas fases do ciclo celular.

#### **2.2.4 Controle do ciclo celular**

Cada fase do ciclo celular possui eventos únicos e fundamentais, sem os quais não é possível atingir o objetivo final, ou seja, a divisão celular; destarte, de forma a garantir a estabilidade desses eventos, incluindo a fidelidade e integridade da replicação do material genético, os mecanismos de checagem e reparo, bem como as reações bioquímicas que controlam a transição de uma fase a outra do ciclo, se mantiveram conservados e extremamente precisos pela evolução (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997). É um processo “supervisionado por uma bateria de genes diversos cujo trabalho é garantir que esta sequência seja realizada corretamente” (GRIFFITHS et al., 2001, p. 85), constituindo-se como a principal barreira protetora contra os danos ao DNA (RIBEIRO et al., 2003).

---

<sup>6</sup> Formado pelos microtúbulos derivados do fuso mitótico, contém proteínas motoras responsáveis pelo transporte de substâncias para o centro da célula (ALBERTS et al., 2010).

<sup>7</sup> Extensões tubulares da membrana plasmática que atravessam a parede celular e conectam o citoplasma das células adjacentes (TAIZ, ZEIGER, 2013).

Os pontos de controle do ciclo são sistemas constituídos por vários componentes cuja atuação envolve uma série de cascatas de transdução de sinal e atuam diretamente sobre a transcrição, modificação pós-transcricional e degradação das unidades catalíticas denominadas cinase dependentes de ciclina (Cdks), responsáveis por controlar as transições entre as etapas do ciclo (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2003). A atuação das Cdks no ciclo celular é determinada pelo aumento ou diminuição na quantidade de quatro tipos de proteínas reguladoras, denominadas ciclinas:

1. As G<sub>1</sub>/S-ciclinas ativam as Cdks ao final de G<sub>1</sub> e, com isso, ajudam a desencadear a progressão ao Início, resultando no comprometimento à entrada no ciclo celular. Seus níveis caem na fase S;
  2. As S-ciclinas se ligam a Cdks logo após a progressão ao Início e ajudam a estimular a duplicação dos cromossomos. Os níveis das S-ciclinas permanecem elevados até a mitose e essas ciclinas também contribuem ao controle de alguns eventos mitóticos iniciais;
  3. As M-ciclinas ativam as Cdks que estimulam a entrada na mitose no ponto de verificação G<sub>2</sub>/M.
- [...] uma quarta classe de ciclinas, as G<sub>1</sub>-ciclinas, ajuda a regular as atividades das G<sub>1</sub>/S-ciclinas, as quais controlam, no final da G<sub>1</sub>, a progressão ao Início (ALBERTS et al., 2010, p. 1062).

Nos vegetais, a Cdk predominante é a do tipo D, cuja performance, segundo Taiz e Zeiger (2013), é controlada pelos hormônios vegetais citocininas e brassinosteróides, especialmente durante o final da fase G<sub>1</sub>, onde agem aumentando a quantidade de ciclina D<sub>3</sub>, que sinaliza para a entrada em novo processo de divisão.

Assim, em resposta à passagem da célula pela divisão, a expressão das ciclinas aumenta e, conseqüentemente, se eleva o número de Cdks ativadas; isso permite a progressão da fase G<sub>1</sub> para a fase S (RIBEIRO et al., 2003). Entretanto, mesmo após a ligação da cinase ao sítio de ativação da Cdk, o complexo ciclina-Cdk ainda não está apto a induzir os eventos específicos do ciclo celular, necessitando que ocorra a fosforilação de um aminoácido ao redor do sítio de ativação; tal evento é realizado pela proteína cinase ativadora de Cdk – CAK (ALBERTS et al., 2010).

Os principais pontos de checagem localizam-se na transição da fase G<sub>1</sub> para a fase S, na transição entre G<sub>2</sub> e mitose e na transição de metáfase para anáfase (RIBEIRO et al., 2003; ALBERTS et al., 2010). Além disso, há o ponto de checagem do fuso que impede a progressão para a anáfase caso todos os microtúbulos não tenham interagido corretamente com o cinetócoro (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No ponto de checagem ao final de G<sub>1</sub>, danos no material genético causam a superexpressão da proteína p53, fundamental para a manutenção da integridade do genoma, culminando no estacionamento do ciclo celular em G<sub>1</sub> até que o reparo do DNA seja efetuado; quando isso é feito, a p53 aumenta a transcrição da proteína MDM-2 para inibir a si mesma, permitindo que a célula avance para a fase S (RIBEIRO et al., 2003; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Por outro lado, caso os danos sejam irreparáveis, como injúrias provocadas por substâncias tóxicas ao DNA, a p53 estimula a transcrição da proteína BAX, que sinalizará para que a célula entre em morte celular programada, fenômeno conhecido como apoptose e pelo qual ocorre a eliminação de células danificadas (RIBEIRO et al., 2003). Mutações no gene que codifica a p53 geram uma anomalia no ponto de checagem de G<sub>1</sub> que permite à célula entrar na fase S sem reparar as lesões, culminando – posteriormente - em uma “mitose catastrófica [ou seja,] uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea” (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Para os autores, apesar de não ser uma forma direta de morte, erros desta magnitude na mitose compreendem uma sinalização irreversível para a morte.

Os pontos de controle do final de G<sub>1</sub> e na transição da G<sub>2</sub> para a mitose são fundamentais na proteção celular de agentes genotóxicos externos; a transição para a mitose é inibida se ocorrem erros ou alterações que comprometam aspectos como a replicação do DNA, a condensação cromossômica, a desintegração da carioteca e a montagem do fuso mitótico e esses pontos de controle são fundamentais para impedir a segregação dos cromossomos defeituosos (PERALTA-ZARAGOZA et al., 1997; ALBERTS et al., 2010). A ação da Aurora-cinase nesta etapa é fundamental para garantir a passagem da célula pelas diversas fases do ciclo, uma vez que é responsável por garantir a correta fixação dos microtúbulos na montagem do fuso, além de ter importante atuação na orientação dos cromossomos e na citocinese; a superexpressão desta cinase leva a uma entrada precoce na mitose devido à hiperatividade dos centrosomos, podendo resultar em instabilidade cromossômica (GOLLAPUDI; HASEGAWA; EASTMOND, 2014).

O terceiro ponto de verificação, localizado na transição entre metáfase e anáfase e regula a separação das cromátides-irmãs, garantindo que ela ocorra de forma



correta para que a mitose se conclua perfeitamente e a citocinese aconteça. Diferentemente dos outros pontos de checagem, cujo acionamento se dá por ativação dos complexos ciclina-Cdks, a transição de metáfase à anáfase é dependente da destruição destes, conduzindo aos estágios finais da divisão celular (ALBERTS et al., 2010). Esta etapa é regulada pelo complexo promotor da anáfase (APC/C), cujas funções englobam a destruição da proteína que mantém as cromátides-irmãs unidas, permitindo – com isso - a entrada da célula em anáfase, e a destruição das S-ciclins e M-ciclins, causando, destarte, a inativação das Cdks e permitindo, conseqüentemente, a realização das etapas finais da mitose. “Quando as G<sub>1</sub>/S-Cdks são ativadas no final de G<sub>1</sub>, o APC/C é desligado, permitindo com isso o acúmulo de ciclins para o início do próximo ciclo celular” (ALBERTS et al., 2010, p.1064).

### 2.3 MUTAÇÕES: CONSEQUÊNCIA DE FALHAS NOS MECANISMOS DE REPARO

Além de ser uma molécula estável, o DNA está exposto constantemente a produtos tóxicos oriundos do próprio metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio, e provenientes de fontes exógenas, como poluentes ambientais, metabólitos de outras plantas, etc. Visando garantir a estabilidade do genoma e, desta forma, a sobrevivência das espécies, ao longo do curso evolutivo, as células desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos capazes de reparar quase todas as lesões do material genético, fato pelo qual as mutações severas são eventos raros (RIBEIRO et al., 2003). Esses mecanismos de reparo agem utilizando como molde um filamento de DNA, o que só é possível graças à complementaridade do material genético (GRIFFITHS et al., 2006).

É fato que a sobrevivência em longo prazo de uma espécie depende de alterações genéticas estáveis e herdáveis - mutações<sup>8</sup> - nos alelos (variações de um mesmo gene) que, por meio da Seleção Natural, selecionem os indivíduos mais aptos; estas modificações constituem o substrato para a evolução adaptativa (ALBERTS et al., 2010; SILVA et al., 2014) e podem ser incluídas em três grupos: as que trazem vantagens aos indivíduos que as possuem, sendo, por isso, mantidas pela evolução;

---

<sup>8</sup> Alterações hereditárias do material genético, decorrentes de erros de replicação antes da divisão celular e não causadas por recombinação ou segregação; podem afetar qualitativa ou quantitativamente o gene (GRIFFITHS et al., 2001; FONSECA; PEREIRA, 2004).

aquelas que são deletérias, sendo eliminadas; e as neutras (FREIRE-MAIA, 2012). Todavia, é fato também que essa sobrevivência só se mantém se houver estabilidade genética, ou seja, se os mecanismos de reparo do DNA atuarem com toda a sua capacidade prodigiosa (FRIEDBERG, 2016); quando eles falham, as lesões no material genético podem modificá-lo permanentemente (RIBEIRO et al., 2003).

As mutações podem causar alterações em genes ou em cromossomos.

As alterações cromossômicas [estão] relacionadas à estrutura cromossômica, em consequência de deleções, duplicações, inversões e translocações maiores, ou ao número de cromossomos, em decorrência de falhas na citocinese, por não disjunção mitótica, etc. As mutações gênicas [por sua vez] são devidas à substituição de bases inserções, deleções e translocações (SILVA et al., 2014).

Conforme Griffiths e outros (2006), o material genético é constantemente submetido a um cabo de guerra entre processos químicos que o danificam, levando a novas mutações, e os mecanismos de reparo que monitoram o DNA de forma constante a fim de corrigir os danos gerados. Considerando o fato de que lesões no material genético podem ser causadas por agentes químicos de diversas classes (POHREN; COSTA; VARGAS, 2013), a vida moderna permite a coexposição a diversos mutágenos<sup>9</sup> que, juntos, podem agravar as lesões infringidas ao DNA, impedindo que a maquinaria celular aja eficazmente (GIORGI et al., 2014).

Em populações bem adaptadas, as mutações que surgem são, frequentemente, prejudiciais às células (FREIRE-MAIA, 2012) e resultam de modificações que ocorrem em curto prazo na estrutura do DNA; podem interferir em processos vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, além de serem as principais responsáveis pela ocorrência de processos cancerígenos e morte celular (MATIOLI, 2001; SILVA; MOURA; NETO, 2015). Ademais, “lesões persistentes no DNA acarretam um funcionamento celular incorreto e um aumento da mutagênese devido a uma maior probabilidade de ocorrerem erros quando da replicação de um molde alterado” (RIBEIRO et al., 2003).

---

<sup>9</sup> Substâncias que elevam a frequência de mutações além de sua ocorrência espontânea (GRIFFITHS et al., 2006; SILVA et al., 2014).

Os mecanismos utilizados pelas substâncias capazes de infligir danos ao material genético são diversos, podendo atuar sobre o fuso mitótico, sobre proteínas específicas de reparo, sobre os cromossomos, etc; por isso, os agentes genotóxicos têm sido divididos em duas classes, conforme seu mecanismo de ação: aneugênicos, que afetam o aparato do fuso mitótico, levando à aneuploidias; e clastogênicos, cuja ação consiste em causar injúrias aos cromossomos (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

A análise de alterações cromossômicas consiste em um dos poucos métodos diretos para avaliação mutagênica e necessita de um organismo-teste que esteja em constante divisão mitótica, permitindo a observação de alterações ao longo de todo o ciclo celular e que se manifestam como inibição da divisão, interrupção em metáfases, surgimento de pontes e micronúcleos, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, dentre outros (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Portanto, o estudo de agentes potencialmente genotóxicos é extremamente importante, não só para a compreensão dos efeitos da mutação sobre o organismo, mas - também - por este agente oferecer perigo a qualquer tipo de células (animal, vegetal ou microrganismos), haja vista a universalidade do código genético.

#### 2.4 O BIOENSAIO *Allium cepa* COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA

Para a real efetividade dos biotestes, é fundamental que o organismo escolhido como bioindicador seja fenotipicamente mais sensível a lesões no material genético, expressando em um curto espaço de tempo, portanto, respostas a qualquer alteração externa a que são submetidos (VIEIRA; DANTAS, 2015); além disso, deve ser capaz de detectar os agentes tóxicos em mais de um ambiente, bem como permitir a verificação de diversas classes de danos em suas células. Desta forma, os bioindicadores são ferramentas importantes nos estudos ambientais uma vez que, segundo Arraes e Longhin (2012), fornecem respostas mais precisas e rápidas sobre o cenário ao qual se encontra o ecossistema estudado.

Além das características supracitadas, para um organismo ser um indicador biológico ideal, ele precisa

[...] ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível pela sociedade comum; possuir distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; ter baixa variabilidade genética e ecológica; [...]; ter curto ciclo de vida; dispor de características ecológicas bem conhecidas e poder ser usado em estudos laboratoriais (JOHSON et al. apud ARRAES; LONGHIN, 2012).

Para Leme e Marin-Morales (2009), de acordo com o sistema empregado e a característica genética observada, podem-se dividir os sistemas-teste em dois grupos: bioensaios com procariotos, no qual se identificam injúrias primárias ao DNA, e bioensaios com eucariotos, que permitem a análise de grandes danos, que variam de mutações gênicas a lesões cromossômicas e aneuploidias.

Dentre os sistemas que utilizam organismos eucariotos, os vegetais superiores constituem um importante modelo para identificação de substâncias tóxicas, uma vez que os resultados obtidos são suficientes para alertar quanto aos riscos a outros sistemas biológicos, haja vista a universalidade do código genético, alvo dessas substâncias (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; FIRBAS; AMON, 2013). De fato, a correlação de biotestes vegetais com outros sistemas, incluindo mamíferos, é superior a 80% (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; ARRAES; LONGHIN, 2012; TEDESCO et al., 2015), fazendo com que seu uso se fortaleça em meio à comunidade científica como forma eficaz de avaliação da genotoxicidade e - especialmente - das aberrações mitóticas em eucariontes (POHREN; COSTA; VARGAS, 2013).

Para Leme e Marin-Morales (2009), Mohammed (2010) e Felicidade e colaboradores (2014), as plantas se destacam não somente quanto à sensibilidade a substâncias genotóxicas, mas também ao potencial para manifestar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em células de diferentes tecidos. Ademais,

As razões para usar sistemas vegetais são muitas: Plantas são fáceis de armazenar, geralmente os cromossomos estão em boas condições, baixo custo e, o mais importante, possuem uma boa correlação para outros sistemas-teste (FISKESJÖ, 1985, tradução nossa).

Conforme Fiskesjo (apud TEDESCO et al., 2015), apesar dos organismos de plantas e animais apresentarem particularidades, os princípios metabólicos são similares, justificando a extrapolação dos resultados para animais e humanos. Além disso, a presença de enzimas oxidase no metabolismo vegetal permite que eles ativem os

pró-mutágenos em mutágenos sem necessitar da adição dessas enzimas ao meio, como ocorre nos testes com bactérias (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Dentre os vegetais superiores, o bioteste *Allium cepa* (cebola), introduzido em 1949 por Levan, é um dos testes *in vivo* mais empregados na avaliação do potencial citotóxico e genotóxico/mutagênico de metabólitos secundários vegetais em suas diversas concentrações e em diferentes tempos de exposição (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012); devido ao baixo número cromossômico ( $2n = 16$ ), rápido ciclo celular, fácil manipulação, alta sensibilidade à grande variedade de substâncias e excelente correlação com outros bioensaios, este sistema-teste permite a detecção de danos tanto em parâmetros macroscópicos, por alterações na cor, tamanho e morfologia das raízes, quanto microscópicos, por meio de alterações durante o processo mitótico (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MOHAMMED, 2010; ARRAES; LONGHIN, 2012). Além disso, anomalias cromossômicas espontâneas são extremamente raras nesta espécie, tornando-o confiável para associar os danos ocorridos ao efeito da substância testada (FIRBAS; AMON, 2013).

Também conhecido como teste de avaliação de alterações cromossômicas, o bioensaio *Allium cepa* é mundialmente reconhecido pela comunidade científica como eficaz para análise de genotoxicidade, tendo seu emprego validado pelo Programa Internacional de Segurança Química da Organização Mundial da Saúde (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas - UNEP (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; FIRBAS; AMON, 2013; TEDESCO et al., 2015). Constitui, segundo Charoenying, Teerarak e Laosinwattana (2010), um dos melhores modelos biológicos para avaliação de danos em cromossomos e distúrbios ocorridos no ciclo celular por químicos que penetraram na célula durante o processo, além de permitir a determinação do mecanismo pelo qual essa interferência ocorre.

Em comparação a outros vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* tem demonstrado maior sensibilidade a substâncias tóxicas (ARRAES; LONGHIN, 2012) e, diferentemente de outros testes, seu emprego permite a avaliação simultânea e comparada de diversos parâmetros, como germinação, tamanho e morfologia radicular, células mortas e aberrantes e índice mitótico (PATNAIK; ACHARY; PANDA, 2013; AHMED, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação mutagênica dos extratos etanólicos foliares de três espécies invasoras presentes em Unidades de Conservação Estaduais (*Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam e *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os potenciais citotóxico, aneugênico e clastogênico dos extratos etanólicos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl sobre o desenvolvimento inicial de células meristemáticas radiculares de *A. cepa*;
- Inferir se há relação entre mudanças intracelulares e os efeitos alelopáticos observados quando da utilização dos extratos etanólicos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Genética de Plantas e Toxicológica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

A coleta e secagem das folhas de *Acacia mangium* Willd, *Artocarpus heterophyllus* Lam e *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl, bem como os procedimentos relativos ao preparo dos extratos etanólicos e estabelecimento das concentrações testadas foram realizados conforme descrito no Capítulo I do presente trabalho.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA SOBRE O SISTEMA-TESTE *Allium cepa*

As sementes de *Allium cepa* – cultivar Baia Periforme – foram obtidas de uma fonte comercial e selecionadas pelo mesmo lote - nº. 25870 – sendo, porém, não-clonais; o tratamento para verificação do potencial mutagênico seguiu o procedimento descrito abaixo (FISKEJO, 1985):

Trinta sementes de *A. cepa* foram acondicionadas em placas de Petri recobertas com uma folha de papel filtro e submetidas à germinação em 5 mL de água deionizada (controle negativo - CN), 5 mL de solução de Trifluralina<sup>10</sup> à 1,9 µL/mL (controle positivo - CP) ou em 5 mL dos extratos etanólicos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl nas concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL. Seguiram-se dois tipos de tratamento:

1. Tratamento contínuo: As sementes germinaram diretamente em água deionizada (CN), na solução de trifluralina (CP) ou nas diferentes concentrações dos extratos (1, 5, 10 e 50 mg/mL).
2. Tratamento descontínuo: As sementes inicialmente germinaram em água destilada até atingirem cerca de 1,0 cm de comprimento; em seguida, foram transferidas a seus respectivos tratamentos e após 20h (tratamento agudo),

---

<sup>10</sup> Herbicida comercial (445 g/L), cuja composição química é 2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)benzenamina. É considerado carcinogênico e classificado como Classe II, devido ao seu potencial toxicológico (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

metade das raízes foram coletadas aleatoriamente. O restante permaneceu recebendo o tratamento correspondente até completar 72h (tratamento crônico).

Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma de ácido acético) e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas, sendo, posteriormente acondicionadas na geladeira.

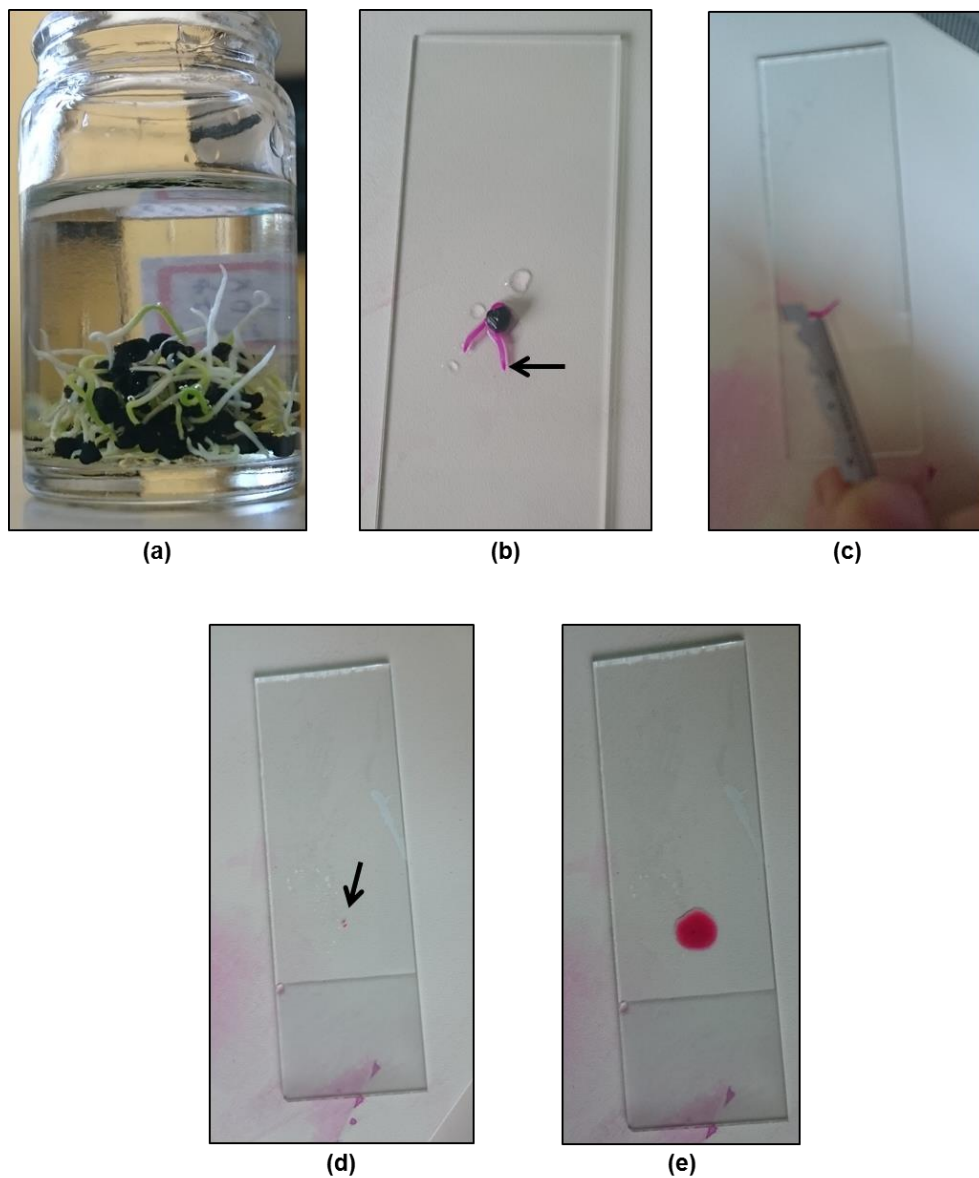
#### **4.2.1 Preparação citológica e análise das lâminas:**

Para o preparo das lâminas (dez por tratamento), as raízes foram retiradas do fixador e lavadas em água destilada; após, realizou-se o método de esmagamento comum suave onde, primeiramente, as raízes foram submetidas à hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C por 5 minutos, lavadas em água destilada para a completa retirada do ácido e expostas à coloração, no escuro, em Reativo de Schiff por 2 horas. Após, a região meristemática foi seccionada e esmagada com 1 gota de Orceína acética à 1%; as lamínulas foram descoladas com gelo seco e as lâminas permaneceram à temperatura ambiente para completa secagem. Após, novas lamínulas foram fixadas com Entellan, tornando-as permanentes. A figura 3 mostra as principais etapas deste processo.

Seis lâminas de cada tratamento foram avaliadas quanto à genotoxicidade e mutagenicidade, sendo contadas 1000 células em cada lâmina por meio de análise em microscópio óptico binocular COLEMAN – modelo N107, com objetiva de aumento 40X; o total de células analisadas por tratamento foi de 6000.



**Figura 3** – Preparo das lâminas, onde: **(a)** – raízes de *A. cepa* fixadas em Carnoy 3:1; **(b)** – raízes após coloração em Reativo de Schiff, com destaque para a coloração mais escura da região meristemática; **(c)** – corte do meristema radicular; **(d)** – meristema seccionado, em destaque; e **(e)** – meristema coberto com Orceína Acética 1%.



#### 4.2.2 Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

Para análise do efeito citotóxico, calculou-se o índice mitótico pela seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células em divisão}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células observadas}} \times 100$$

Para análise do efeito genotóxico, calculou-se o índice de aberração por meio da fórmula:

$$IA = \frac{\text{nº de células aberrantes}}{\text{nº total de células observadas}} \times 100$$

Para a avaliação dos efeitos aneugênicos, foram analisadas células em divisão portadoras de metáfases irregulares (c-metáfase), alterações nas anáfases (multipolares, com atraso, etc), alterações nas telófases (atrasos), células binucleadas e/ou multinucleadas, aderência e perdas cromossômicas.

$$IEA = \frac{\text{nº de células aneugênicas}}{\text{nº total de células observadas}} \times 100$$

Quanto aos efeitos clastogênicos, avaliou-se a frequência de células portadoras de alterações como pontes e quebras cromossômicas, além de células portadoras de micronúcleos e morte celular.

$$IEC = \frac{\text{nº de células clastogênicas}}{\text{nº total de células observadas}} \times 100$$

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANALISE ESTATISTICA

Os experimentos mutagênicos foram feitos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se dados não-paramétricos e amostragem probabilística, com quatorze tratamentos feitos em triplicatas. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do método Qui-Quadrado, com níveis de significância fixados em  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Acacia mangium* Willd.

A tabela 1 expõe os valores para o índice mitótico (IM) das sementes de *A. cepa* tratadas com as concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd; observa-se que a presença de células nas etapas mais tardias da divisão (metáfase, anáfase e telófase) diminui consideravelmente quando comparada ao controle negativo, fato que refletiu no IM, cuja redução foi significativa em comparação ao CN em todas as concentrações testadas e em todos os tratamentos (contínuo e descontínuos).

Já em relação ao CP, além do CN, os tratamentos contínuo 50 mg/mL, descontínuo agudo 10 mg/mL e descontínuo crônico 1 mg/mL levaram a uma acentuada redução da divisão celular, demonstrando maior citotoxicidade em comparação à trifluralina. Os demais tratamentos não diferiram do CP, ratificando a toxicidade do extrato de *A. mangium* Willd.

O mecanismo de ação da trifluralina consiste em interromper a divisão celular do organismo-alvo, afetando, portanto, o seu desenvolvimento (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), o que a capacita para ser utilizada como controle positivo em testes mutagênicos; além disso, como todo herbicida, possui a capacidade de formar ligações covalentes com centros nucleofílicos de diversas biomoléculas, dentre elas o DNA (CROSBY apud KUCHY; WANI; KAMILI, 2016). A análise do IM das sementes de *A. cepa* tratadas com esta substância corroboram o descrito acima; contudo, a interrupção do ciclo celular foi menor do que o bloqueio causado pelo extrato, uma vez que apresentou mais células nas fases tardias do ciclo do que este.

**Tabela 1** – Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL). I = Intérfase; P = Prófase; M = Metáfase; A = Anáfase; T = Telófase.

Tratamento	Concentração (mg/mL)	I	P	M	A	T	I.M (%)
CN	-	3145	2764	70	63	73	48,82 <sup>##</sup> ± 3,68
CP	1,9 µL/mL	4142	1697	18	4	6	29,58 <sup>**</sup> ± 4,413
TC	1	4522	1514	4	9	10	25,47 <sup>**</sup> ± 3,43
	5	4128	1923	12	10	24	32,42 <sup>*</sup> ± 2,34
	10	4498	1617	0	0	1	26,44 <sup>**</sup> ± 2,62
	50	5135	898	0	0	0	14,91 <sup>** ##</sup> ± 1,00
TD 20h	1	4619	1494	1	2	11	24,67 <sup>**</sup> ± 1,96
	5	4593	1500	5	9	9	25,00 <sup>**</sup> ± 2,50
	10	4949	1069	3	5	9	18,04 <sup>** #</sup> ± 1,35
	50	4721	1397	1	0	1	22,91 <sup>**</sup> ± 2,70
TD 72h	1	4934	1080	7	1	7	18,28 <sup>** #</sup> ± 1,97
	5	4785	1271	4	2	9	21,33 <sup>**</sup> ± 2,24
	10	4843	1309	7	7	18	21,83 <sup>**</sup> ± 2,62
	50	4831	1233	11	10	11	20,92 <sup>**</sup> ± 1,94

\* - significativo para CN a  $p < 0,05$ ; \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; # - significativo para CP a  $p < 0,05$ ; ## - significativo para CP a  $p < 0,01$

Em relação ao Tratamento Contínuo, onde as sementes germinaram diretamente no extrato, nota-se que as concentrações de 10 e 50 mg/mL não apresentaram células nas fases após prófase, indicando que os aleloquímicos presentes no meio podem ter comprometido aspectos fundamentais da replicação do material genético, ativando o ponto de controle entre a G<sub>2</sub> e a mitose e estagnando o ciclo celular em sua fase inicial, não permitindo a segregação cromossômica; tal fato é corroborado ao se observar o tratamento descontínuo agudo, cujas células em fases avançadas da divisão nas concentrações supracitadas são, provavelmente, oriundas da pré-germinação em água. Isso ressalta a importância da realização do tratamento descontínuo, uma vez que este permite inferir os acontecimentos quando da germinação direta no tratamento contínuo; ademais, o tratamento descontínuo

crônico, além de aumentar o tempo de exposição aos metabólitos secundários, permite que as células passem por mais de um ciclo mitótico, elevando as chances de visualização de alterações no processo de divisão e danos ao DNA.

Pathiratne, Hemachandra e Silva (2015) afirmam que a escassez dos estágios em metáfase, anáfase e telófase indicam a ocorrência de retardo ou bloqueio na mitose.

O índice mitótico é indicador de uma proliferação adequada da célula e provê importante parâmetro para avaliar a interferência negativa exercida pelo extrato sobre o processo de ciclo celular (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012; POHREN; COSTA; VARGAS, 2013); além disso, valores significativamente baixos deste parâmetro em comparação ao controle sinalizam alterações no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (HOSHINA, apud LEME; MARIN-MORALES 2009), enquanto valores muito superiores indicam um aumento desenfreado da divisão celular, podendo levar à proliferação desordenada e formação de tumores.

A queda significativa no índice mitótico e, portanto, no número de células que estavam nos estágios avançados da mitose (a partir de metáfase) também foi observada por Charoenying, Teerarak e Laosinwattana (2010) ao avaliarem os efeitos dos compostos secundários presentes no fruto de *Z. limonella* Alston. Em contraste, ao estudar os metabólitos produzidos pelo fungo micorrízico *Trichoderma* sp., Aguiar e outros (2015) identificaram um aumento no índice mitótico, sugerindo que essas substâncias auxiliem o crescimento do tecido radicular da planta associada ao fungo.

Ao se analisar as alterações ocorridas nas poucas células que conseguiram burlar os mecanismos de controle e avançaram para as próximas fases, verifica-se que o índice de aberração (IA) não foi significativamente distinto do controle negativo em nenhuma concentração testada, independente da exposição ao extrato ter sido durante ou posterior à germinação (tabela 2); tal fato pode ser explicado devido à baixa quantidade de células que avançaram no processo de divisão. Entretanto, a não significância quanto ao controle positivo ratifica a ação negativa do extrato sobre o processo de divisão celular.

No caso do tratamento contínuo com 50 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd, o valor nulo do IA é consequência da interrupção do ciclo celular na etapa inicial, não

existindo, portanto, células que estivessem nas fases de segregação cromossômica, momento no qual as anomalias ocorridas podem ser observadas.

Outro dado relevante é o aumento no número de células mortas presentes nos tratamentos com o extrato em comparação ao controle negativo, chegando em alguns momentos a ser superior ao observado para o controle positivo; isso também pode explicar o baixo registro de células aberrantes, uma vez que estas podem ter morrido antes de manifestar as anormalidades. A incidência de morte celular pode estar relacionada à presença dos taninos no extrato de *A. mangium* Willd, que podem se ligar aos complexos proteicos, reduzindo a proliferação celular e podendo levar a célula à apoptose.

**Tabela 2** – Índice de Aberração (I.A) e classes de anomalias celulares das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL). CDV = nº células em divisão; PNT = Ponte; Q&P = Quebra e ponte cromossômicas; CBN = Célula binucleada; MN = Micronúcleo; AMP = Anáfase multipolar; C-M = C-metáfase; AD = Aderência; AT = Atraso; MO = Morte celular. \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ , # - significativo para CP a  $p < 0,01$ .

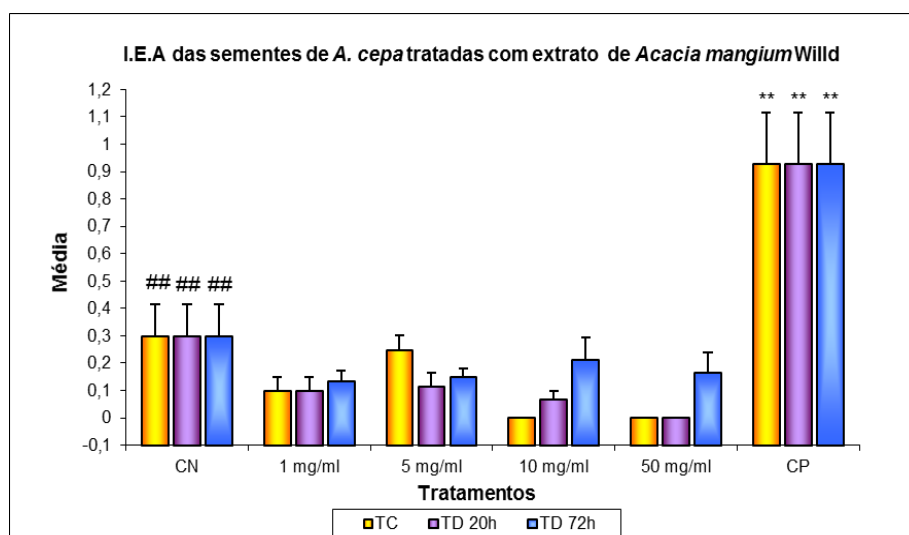
Tratamento	Concentração (mg/mL)	CDV	PNT	Q&P	CBN	MN	AMP	C-M	AD	AT	MO	Total células aberrantes	I.A (%)
CN	-	2987	1	2	2	0	3	6	2	3	0	19	0,313 <sup>#</sup> ± 0,134
CP	1,9 µL/mL	1784	3	23	5	98	0	22	10	1	2	164	2,719 <sup>**</sup> ± 0,607
TC	1	1543	0	0	0	0	0	0	3	3	2	8	0,131 ± 0,070
	5	1983	0	1	1	1	3	0	5	5	7	23	0,376 ± 0,120
	10	1618	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0,082 ± 0,082
	50	898	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000 ± 0,000
TD 20h	1	1514	0	0	0	0	0	0	5	1	0	6	0,098 ± 0,051
	5	1531	1	0	0	1	0	0	6	1	0	9	0,147 ± 0,042
	10	1090	0	1	0	0	0	0	0	3	7	11	0,180 ± 0,125
	50	1399	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0,032 ± 0,020
TD 72h	1	1105	0	4	0	0	1	0	5	0	6	16	0,264 ± 0,087
	5	1296	0	4	0	3	2	0	2	2	0	13	0,214 ± 0,054
	10	1355	0	2	0	0	0	0	5	7	3	17	0,276 ± 0,107
	50	1275	0	6	0	1	0	0	1	3	0	11	0,180 ± 0,090

As classes de aberrações mais frequentes foram perda, aderência, anáfase multipolar, atraso e morte.

Para autores como Leme e Marin-Morales (2009), Souza, P.M.S e outros (2013) e Ping e outros (2012), a análise das aberrações cromossômicas permite avaliar mais profundamente a genotoxicidade do agente testado, uma vez que propicia uma melhor compreensão do mecanismo de ação genotóxica, que pode se manifestar tanto por interferência no processo de ligação dos cromossomos ao fuso mitótico (efeito aneugênico) como causando injúrias nos cromossomos (efeito clastogênico).

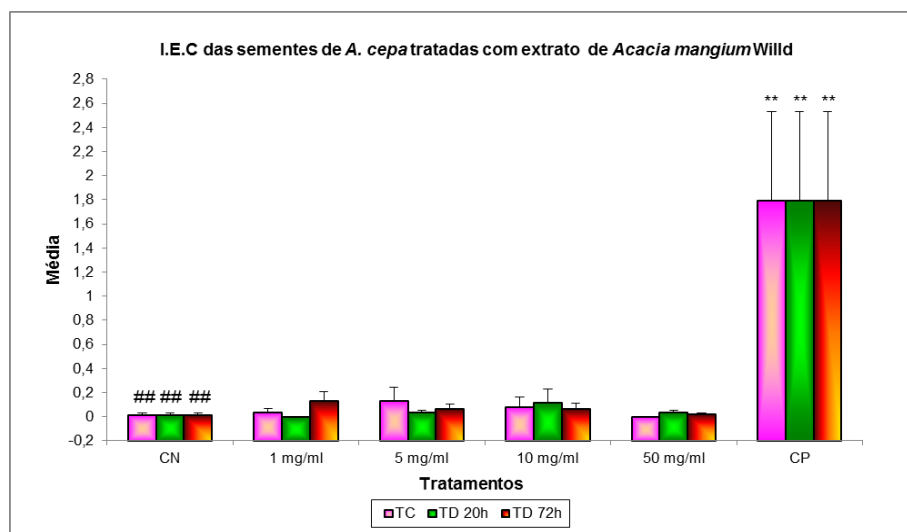
A figura 4 refere-se ao índice de efeito aneugênico (IEA) das sementes tratadas com o extrato de *A. mangium* Willd, enquanto a figura 5 demonstra os dados obtidos quanto ao índice de efeito clastogênico (IEC). Não houve diferença estatística em nenhum desses parâmetros.

**Figura 4** – Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontinuo agudo (TD 20h) e descontinuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL). \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ , ## - significativo para CP a  $p < 0,01$ .





**Figura 5** – Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontinuo agudo (TD 20h) e descontinuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. mangium* Willd (1, 5, 10 e 50 mg/mL).



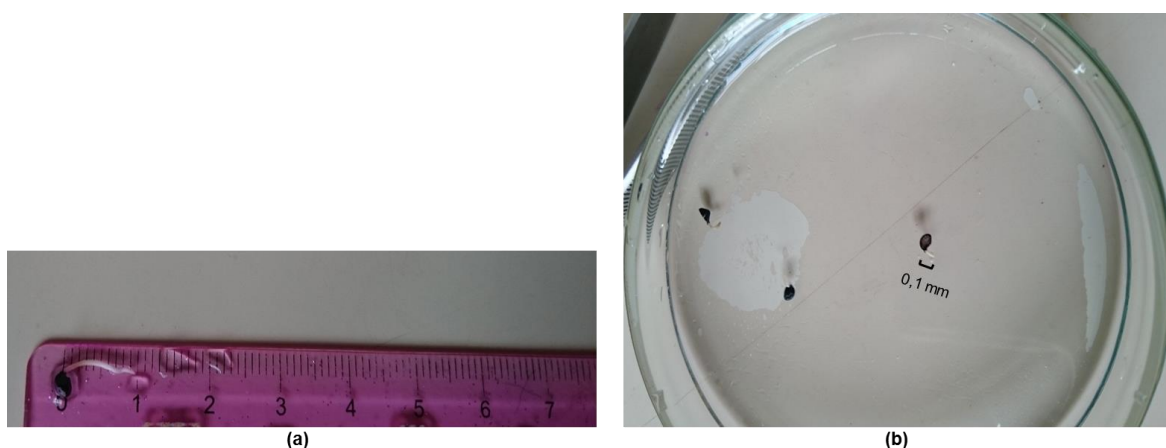
Arraes e Longhin (apud TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012) relataram a importância dos dados fornecidos pelo bioensaio *A. cepa* no concernente a possibilitar uma completa avaliação dos mecanismos pelos quais um agente interfere sobre a genética de um organismo e sobre a célula como um todo, podendo interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso mitótico (aneugenicidade) e/ou induzir à quebra ou perda cromossômica (clastogenicidade).

Segundo Sisino e Oliveira-Filho (2013), uma substância pode ser considerada tóxica ao causar modificações danosas na homeostase do organismo ao qual esta foi administrada. No presente estudo, *A. mangium* Willd comportou-se como um agente citotóxico, porém não genotóxico, uma vez que somente o índice mitótico sofreu alterações significativas; a ausência de genotoxicidade, no entanto, pode ser atribuída a não evolução do processo de divisão celular, bloqueado na prófase.

Conforme dados apresentados no Capítulo I do presente estudo, acerca do crescimento radicular das sementes de *A. cepa*, todas as concentrações testadas do extrato de *A. mangium* Willd apresentaram queda significativa no índice de germinação quase chegando à inibição total, além de redução significativa no comprimento das radículas; comparando esses dados com os baixos valores obtidos para o índice mitótico, pode-se aferir que os efeitos alelopáticos supramencionados se deveram à ação mitodepressiva, uma vez que o desenvolvimento de um

organismo depende diretamente da proliferação celular. As sementes expostas à germinação direta na concentração de 50 mg/mL (Tratamento Contínuo) foram as que apresentaram menores índices mitóticos, e – consequentemente - sofreram maior redução no comprimento radicular, quase chegando à inibição total (figura 6), corroborando a relação entre o índice mitótico e alelopatia, em especial os dados obtidos para índice de germinação e crescimento radicular.

**Figura 6** – Radículas de *Allium cepa* submetidas ao Tratamento Contínuo com **(a)** – controle negativo; **(b)** – 50 mg/mL do extrato de *A. mangium* Willd, demonstrando o tamanho reduzido.



Fonte: Acervo do autor.

## 5.2 AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Artocarpus heterophyllus* Lam.

Quando submetidas à germinação com o extrato de *A. heterophyllus* Lam, as sementes de *A. cepa* tiveram a divisão celular afetada em todas as concentrações testadas, independente do tratamento empregado; ao contrário do ocorrido quando utilizado o extrato de *A. mangium* Willd, mais células conseguiram avançar no processo; no entanto, essa quantidade diminuiu à medida que a concentração se elevou (tabela 3). A concentração de 50 mg/mL do tratamento contínuo não germinou; todavia, quando as radículas foram pré-germinadas em água e transferidas para continuar seu desenvolvimento nesta concentração, nota-se que quase não há células nas fases avançadas da mitose (metáfase, anáfase e telófase), demonstrando a citotoxicidade do extrato em elevadas concentrações e explicando a ausência de germinação do tratamento contínuo.

A não significância deste parâmetro quando comparado ao CP ratifica a influência negativa exercida pelo extrato sobre o ciclo celular; apenas o tratamento

descontínuo crônico na concentração de 50 mg/mL causou alterações significativas, tendo levado à redução mais acentuada no IM do que o observado no CP.

**Tabela 3** – Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL). I = Intérfase; P = Prófase; M = Metáfase; A = Anáfase; T = Telófase.

Tratamento	Concentração (mg/mL)	I	P	M	A	T	I.M (%)
CN	-	3145	2764	70	63	73	48,82 <sup>##</sup> ± 3,68
CP	1,9 µL/mL	4142	1697	18	4	6	29,58 <sup>**</sup> ± 4,413
TC	1	4180	1865	25	16	27	31,77 <sup>*</sup> ± 3,33
	5	4555	1513	12	3	9	25,35 <sup>**</sup> ± 4,42
	10	4404	1701	3	2	6	27,93 <sup>**</sup> ± 3,09
	50	NÃO GERMINOU					
TD 20h	1	4715	1355	17	19	18	23,18 <sup>**</sup> ± 2,95
	5	4243	1843	13	20	14	31,02 <sup>*</sup> ± 3,89
	10	4579	1478	25	12	30	25,35 <sup>**</sup> ± 2,13
	50	3952	2089	1	4	1	34,57 <sup>*</sup> ± 1,83
TD 72h	1	4284	1691	19	19	58	29,57 <sup>**</sup> ± 2,71
	5	4515	1695	17	9	40	28,21 <sup>**</sup> ± 1,89
	10	4533	1499	23	18	46	26,05 <sup>**</sup> ± 0,73
	50	5018	1015	2	1	2	16,92 <sup>**</sup> # ± 1,73

\* - significativo para CN a  $p < 0,05$ ; \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; # - significativo para CP a  $p < 0,05$ ; ## - significativo para CP a  $p < 0,01$ .

O tratamento descontínuo crônico apresentou redução no índice mitótico em um efeito concentração-dependente; resultado similar foi encontrado por Ping e colaboradores (2012) ao estudar o extrato de *Euphorbia hirta* no sistema-teste *Allium cepa*. A queda no número de células do tratamento contínuo que conseguiram concluir a prófase e avançar para as demais fases da divisão celular também apresentou uma relação concentração-dependente, reflexo do acúmulo de metabólitos secundários à medida que se elevava a concentração do extrato.

Em relação ao índice de aberração (IA), semelhante ao extrato de *A. mangium* Willd, não houve alterações significativas em comparação ao controle negativo (figura 4). Todavia, observa-se que, quando se aplica o tratamento descontínuo agudo, ocorre um aumento no número de células radiculares mortas em uma relação concentração-dependente, o que pode explicar a não significância do índice de aberração; no tratamento descontínuo crônico, esse aumento foi observado quando utilizada a maior concentração do extrato de *A. heterophyllum* Lam, corroborando – neste caso - a tese de que o maior acúmulo dos metabólitos secundários elevou a ação tóxica dos mesmos sobre as células.

Segundo Patnaik, Achary e Panda (2013), o surgimento de grande quantidade de células mortas pode sinalizar um distúrbio na maquinaria celular antioxidativa, levando a estresse oxidativo e produção de EROS, gerando mutagênese, instabilidade genômica e apoptose.

**Tabela 4** – Índice de Aberração (I.A) e classes de anomalias celulares das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL). CDV = nº células em divisão; PNT = Ponte; Q&P = Quebra e ponte cromossômicas; CBN = Célula binucleada; MN = Micronúcleo; AMP = Anáfase multipolar; C-M = C-metáfase; AD = Aderência; AT = Atraso; MO = Morte celular. \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; # - significativo para CP a  $p < 0,01$ .

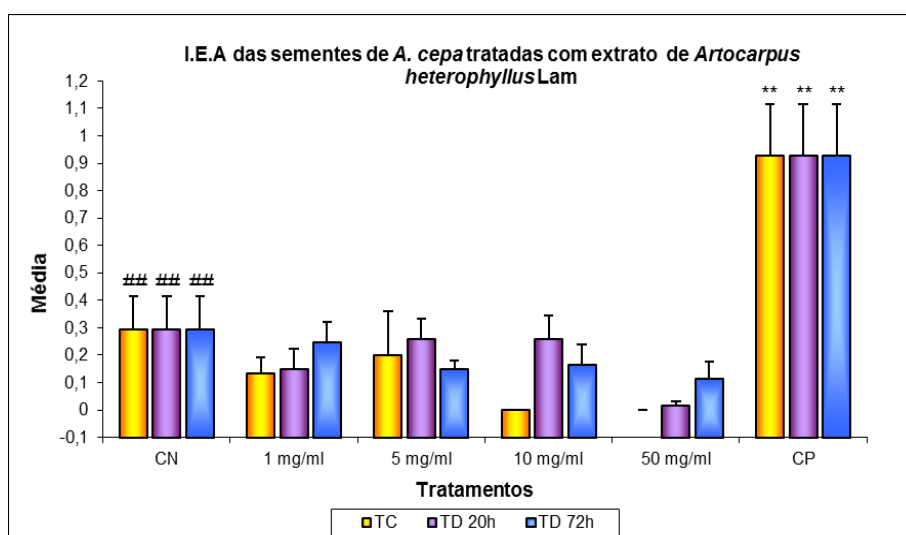
Tratamento	Concentração (mg/mL)	CDV	PNT	Q&P	CBN	MN	AMP	C-M	AD	AT	MO	Total células aberrantes	I.A (%)
CN	-	2987	1	2	2	0	3	6	2	3	0	19	0,313 <sup>#</sup> ± 0,134
CP	1,9 µL/mL	1784	3	23	5	98	0	22	10	1	2	164	2,719 <sup>**</sup> ± 0,607
TC	1	1941	1	0	1	3	2	1	0	4	0	12	0,196 ± 0,071
	5	1546	0	1	3	0	0	8	0	0	0	12	0,198 ± 0,160
	10	1712	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,016 ± 0,016
	50												
NÃO GERMINOU													
TD 20h	1	1418	0	0	0	0	0	1	4	4	1	10	0,163 ± 0,075
	5	1903	0	0	3	0	0	6	5	2	6	22	0,354 ± 0,138
	10	1562	1	0	0	0	2	3	6	5	17	34	0,553 ± 0,259
	50	2095	0	0	1	0	0	0	0	0	16	17	0,283 ± 0,263
TD 72h	1	1801	0	0	1	0	1	4	9	0	0	15	0,245 ± 0,075
	5	1769	0	0	1	1	2	1	4	1	0	10	0,164 ± 0,041
	10	1596	0	0	0	1	1	0	6	3	0	11	0,180 ± 0,075
	50	1025	0	0	2	0	0	0	2	3	13	20	0,330 ± 0,144

Células binucleadas, C-metáfase, aderência, atraso e morte celular foram as alterações mais frequentes encontradas nas células meristemáticas tratadas com *A. heterophyllum* Lam.

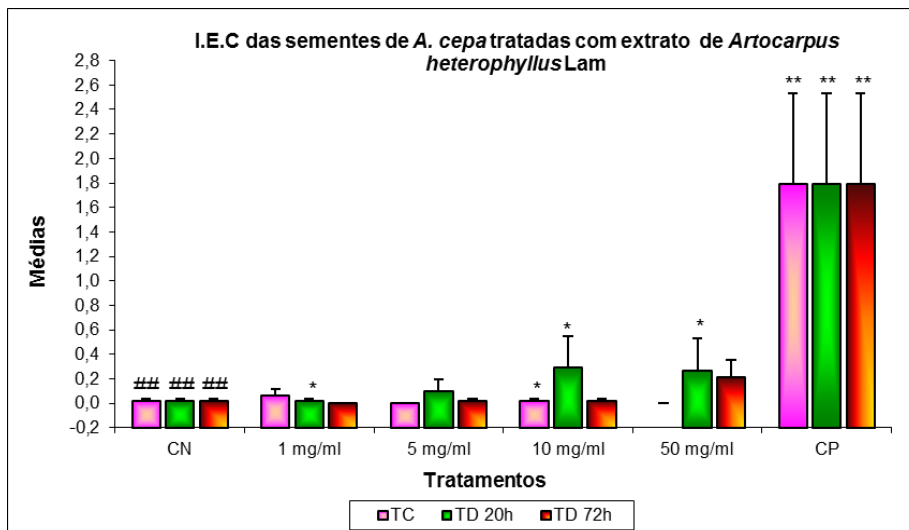
O estudo das classes de aberrações cromossômicas provê uma forma eficaz para investigar o potencial genotóxico da substância testada (PING et al., 2012). As figuras 7 e 8 referem-se aos efeitos aneugênico e clastogênico, respectivamente, observados nas sementes de *A. cepa* tratadas com o extrato de *A. heterophyllum* Lam. Enquanto não ocorreram alterações significativas no primeiro, houve um aumento significativo no número de células com alterações clastogênicas na concentração de 10 mg/mL do tratamento contínuo e em 1, 10 e 50 mg/mL do tratamento descontínuo agudo.

Não houve diferenças em comparação ao controle positivo, confirmando o efeito clastogênico observado.

**Figura 7** – Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL). \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ , ## - significativo para CP a  $p < 0,01$ .



**Figura 8** – Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam (1, 5, 10 e 50 mg/mL). \* - significativo para CN a  $p < 0,05$ ; \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; ### - significativo para CP a  $p < 0,01$ .



O efeito clastogênico observado no tratamento descontínuo agudo, especialmente nas concentrações de 10 e 50 mg/mL, pode ser atribuído ao grande número de células mortas encontradas, pois, como mencionado por Klauck, Rodrigues e Silva (2013), lesões específicas no DNA podem levar as células à morte. Por outro lado, a ausência de células mortas pode explicar a não significância deste parâmetro quando se avalia o tratamento descontínuo crônico.

As radículas submetidas ao tratamento descontínuo crônico com 50 mg/mL apresentaram alteração na coloração, o que interferiu na reação com o corante, apresentando células muito mais claras do que aquelas coradas corretamente (figura 9), dificultando a análise. Tanto o aumento na ocorrência de células mortas quanto à má interação com o corante podem ter sido causados pelos taninos presentes no extrato, uma vez que, conforme relatado por Simões e outros (2017), apoptose e alterações na permeabilidade celular são efeitos atribuídos a essas substâncias.

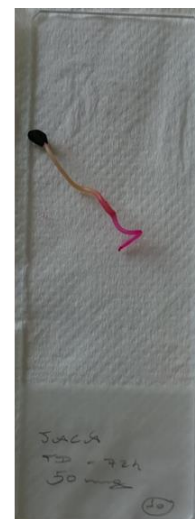
O fato de não terem sido registradas mudanças consideráveis no índice de aberração, mas ocorrer elevação significativa no índice de efeito clastogênico só corrobora a importância em se proceder à análise da ação genotóxica de um agente

apesar do resultado obtido para o índice de aberração, uma vez que isso permite avaliar por qual mecanismo a divisão celular está sendo afetada.

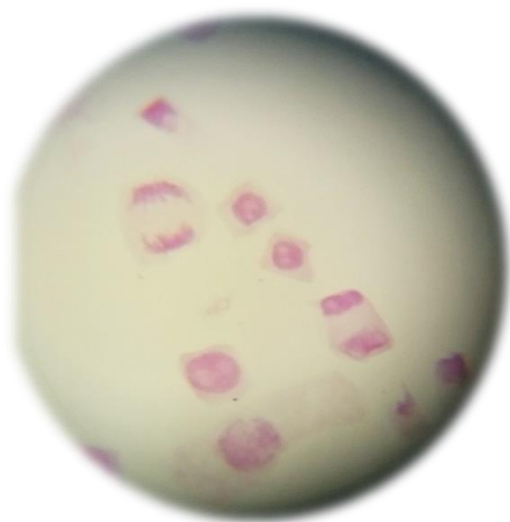
**Figura 9** – Radículas de *Allium cepa* submetidas ao tratamento descontínuo crônico com 50 mg/mL do extrato etanólico foliar de *A. heterophyllum* Lam. **(a)** – coloração alaranjada apresentada após o tratamento; **(b)** – radícula após coloração em Reativo de Schiff, onde não se observa uma nítida diferenciação da região meristemática; **(c)** – células que responderam corretamente à coloração; e **(d)** – células tratadas com 50mg/mL em tratamento descontínuo crônico, após a coloração.



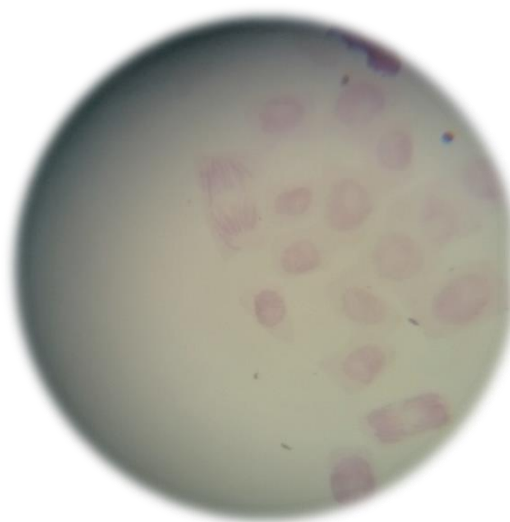
(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: Acervo do autor.

Os estudos de Klauck, Rodrigues e Silva (2013) com lixiviados originados de resíduos sólidos urbanos ratificam a importância da análise das diferentes classes de alterações cromossômicas, independentemente dos resultados com o índice de aberração; os autores não registraram mudanças expressivas em relação à testemunha quanto à incidência de células portadoras de pontes, quebras e perdas



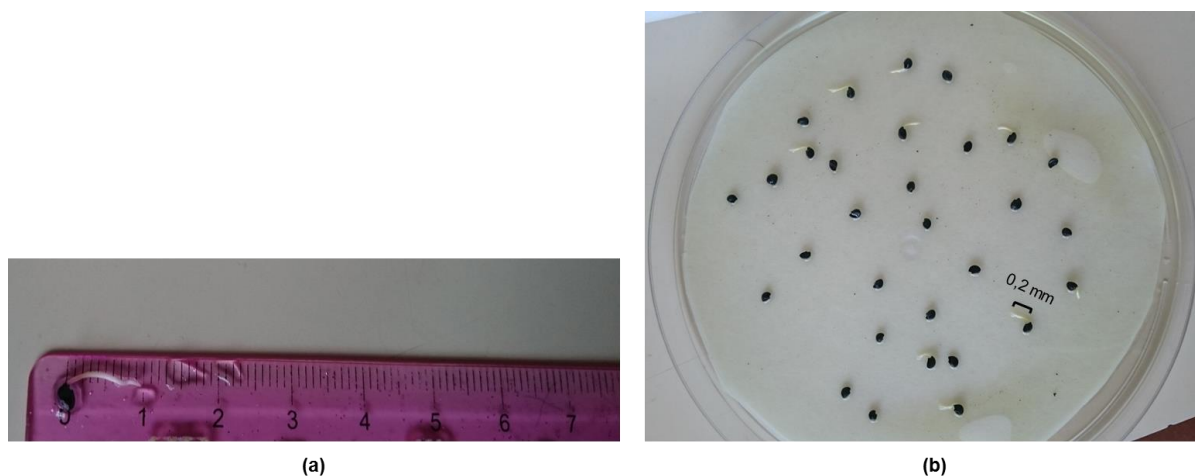
cromossômicas, mas a frequência total de anomalias sofreu um aumento significativo.

A análise da proliferação celular por meio do sistema *Allium cepa* é importantíssima para reconhecimento de substâncias com capacidade de agir sobre a replicação e transmissão do material genético, bem como de causar alterações cromossômicas – clastogenicidade (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE 2012); embora estas alterações possam permitir que o processo de divisão celular chegue ao fim, o desenvolvimento e a sobrevivência do organismo afetado ficam profundamente comprometidos.

Pohren, Costa e Vargas (2013) diferenciam o efeito genotóxico do mutagênico afirmando que, no primeiro, as alterações ocorridas no material genético ainda podem ser revertidas pelos mecanismos de correção inerentes da maquinaria celular, enquanto no segundo isso não seria mais possível; portanto, a mutagenicidade seria um efeito genotóxico cuja reversão não mais ocorrerá, perpetuando-se às células-filhas. Desta forma, o extrato de *A. heterophyllum* Lam mostrou efeito tanto citotóxico (por meio de alteração no índice mitótico) quanto mutagênico, uma vez que foram identificadas alterações clastogênicas nas células tratadas com o extrato supracitado. Flavonoides, presentes no extrato de *A. heterophyllum* Lam, possuem a capacidade de causar alterações no material genético (SIMÕES et al., 2017), o que pode explicar o efeito clastogênico observado.

Comparando os dados obtidos para mutagenicidade com os resultados alelopáticos contidos no Capítulo I, é possível aferir a existência de relação direta entre os dois, visto que as sementes tratadas com o extrato de *A. heterophyllum* Lam tiveram redução na capacidade de germinação e no comprimento radicular, principalmente em 10 mg/mL (figura 10), além de queda no índice mitótico; em suma, a alteração no ciclo celular, restringindo o processo à sua fase primária, prejudicou o desenvolvimento das sementes ao ponto de chegar à total inibição da germinação em 50 mg/mL. Isso corrobora a afirmação de autores como Sisino e Oliveira-Filho (2013) de que a toxicidade de um composto pode se refletir em níveis moleculares, fisiológicos, celulares e bioquímicos, sendo importante investigar mais de um aspecto.

**Figura 10** – Radículas de *Allium cepa* submetidas ao Tratamento Contínuo com **(a)** – controle negativo; **(b)** – 10 mg/mL do extrato de *A. heterophyllum* Lam, demonstrando o tamanho reduzido.



Fonte: Acervo do autor.

Associação positiva entre valores reduzidos de índice mitótico e queda no comprimento das radículas de *A. cepa* foi registrada por Radić e outros (2014) ao estudarem os efeitos tóxicos e genotóxicos de águas contaminadas com ácido sulfúrico derivado de áreas mineradas, chegando a ser mais significativo que o controle positivo empregado (etilmetanosulfonato - EMS). Teerarak, Laosinwattana e Charoenying (2010) também encontraram correlação entre os dois parâmetros ao avaliarem os efeitos do extrato metanólico de folhas de *Jasminum officinale* f. cv. *grandiflorum* (L.) Kob sobre duas espécies vegetais; além disso, eles reforçaram a importância desse tipo de estudo como alternativa para o manejo florestal, reduzindo o uso de herbicidas sintéticos.

### 5.3 AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Eriobothrya japonica* (Thunb.) Lindl.

O índice mitótico das sementes tratadas com extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. apresentou redução significativa em todas as concentrações de todos os tratamentos (tabela 5), tendo ocorrido interrupção do ciclo em sua fase inicial quando utilizada a concentração de 50 mg/mL do tratamento contínuo; para o tratamento descontínuo crônico, observou-se uma relação concentração-dependente na redução deste parâmetro, indicando que o acúmulo dos metabólitos secundários foram determinantes para o efeito observado.

Não houve modificações significativas em comparação ao controle positivo, exceto em relação ao tratamento descontinuo agudo na concentração de 5 mg/mL, cujo IM foi menor do que o valor obtido para a trifluralina.

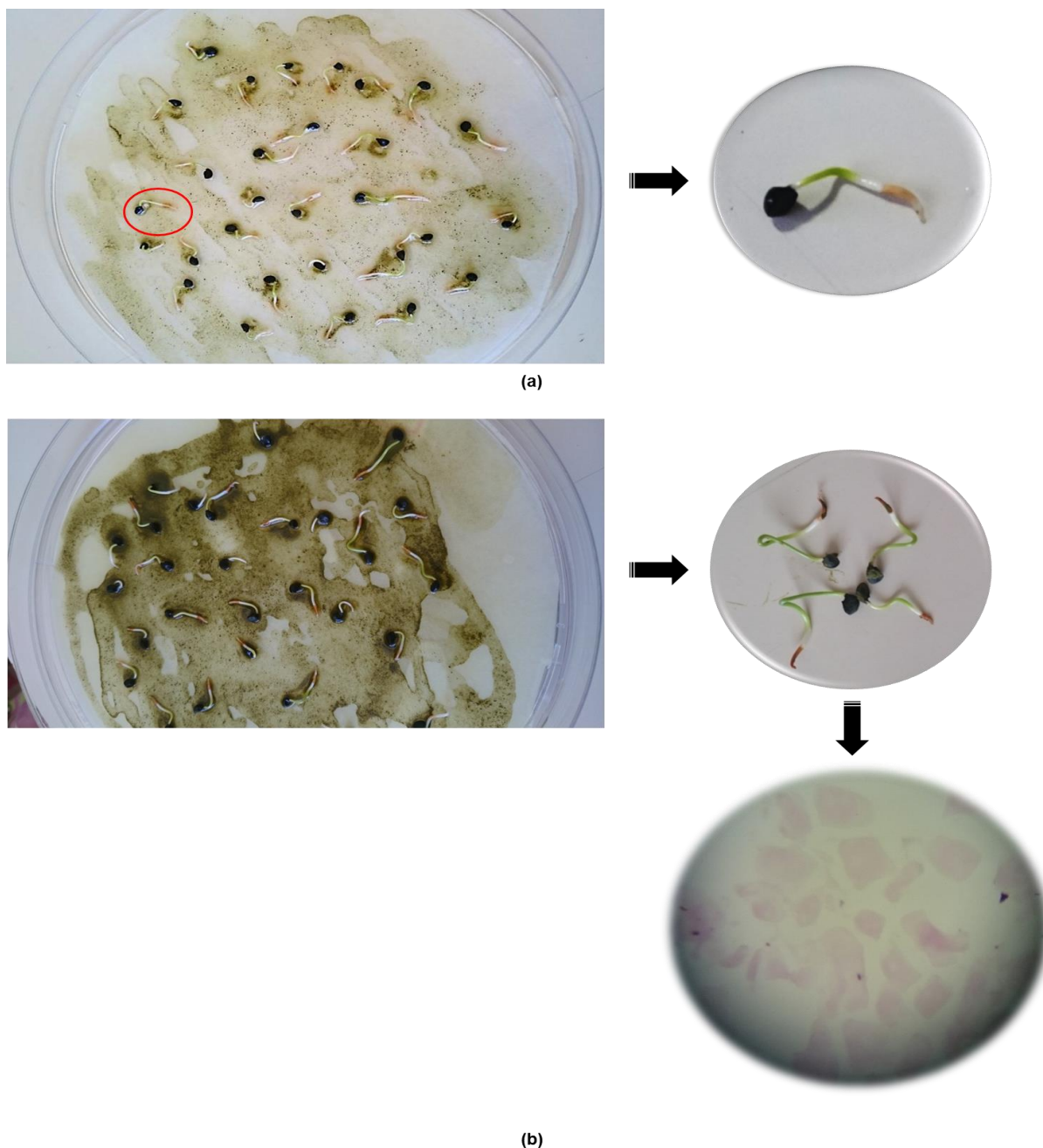
**Tabela 5** – Número de células meristemáticas normais em diferentes fases do ciclo celular e Índice Mitótico (I.M) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontinuo agudo (TD 20h) e descontinuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. (1, 5, 10 e 50 mg/mL). I = Intérfase; P = Prófase; M = Metáfase; A = Anáfase; T = Telófase.

Tratamento	Concentração (mg/mL)	I	P	M	A	T	I.M (%)
CN	-	3145	2764	70	63	73	48,82 ± 3,68
CP	1,9 µL/mL	4142	1697	18	4	6	29,58 ± 4,413
TC	1	4549	1295	38	33	32	23,61** ± 4,42
	5	4523	1461	37	28	40	25,86** ± 1,59
	10	4318	1668	20	17	20	28,44** ± 4,37
	50	4416	1720	0	0	0	27,92** ± 3,41
TD 20h	1	4709	1250	18	15	25	22,02** ± 2,16
	5	5071	1106	23	8	14	18,51** # ± 1,70
	10	4752	1368	57	15	42	23,95** ± 3,45
	50	4318	1798	15	11	9	30,02** ± 2,91
TD 72h	1	4522	1539	18	18	29	26,43** ± 3,69
	5	4541	1487	24	10	19	25,53** ± 2,66
	10	4686	1392	36	29	31	23,85** ± 4,10
	50	NÃO RESPONDEU À COLORAÇÃO					

\*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; # - significativo para CP a  $p < 0,05$ ; ### - significativo para CP a  $p < 0,01$ .

Em relação às alterações morfológicas verificadas durante o desenvolvimento do organismo-teste, todos os tratamentos que utilizaram as concentrações de 10 e 50 mg/mL apresentaram escurecimento na cor das radículas, em especial na região meristemática, chegando a interferir na permeabilidade ao corante Reativo de Schiff no tratamento descontinuo crônico com 50 mg/mL, impossibilitando a diferenciação da região nuclear e impedindo a análise das células (figura 11).

**Figura 11** – Radículas de *Allium cepa* tratadas com *E. japonica* (Thunb.) Lindl., apresentando coloração alterada na região meristemática. **(a)** – tratamento contínuo com 10 mg/mL do extrato etanólico foliar; e **(b)** – tratamento descontínuo crônico com 50 mg/mL do extrato etanólico foliar, demonstrando o aspecto das células após coloração em Reativo de Schiff.



Fonte: Acervo do autor.

Alteração morfológica manifestada por escurecimento das pontas das radículas de *A. cepa* também foi observada por Pathiratne, Hemachandra e Silva (2015) ao investigarem os efeitos tóxicos e genotóxicos de efluentes industriais.

Em relação ao índice de aberração, houve aumento significativo na concentração de 10 mg/mL do tratamento contínuo (tabela 6).

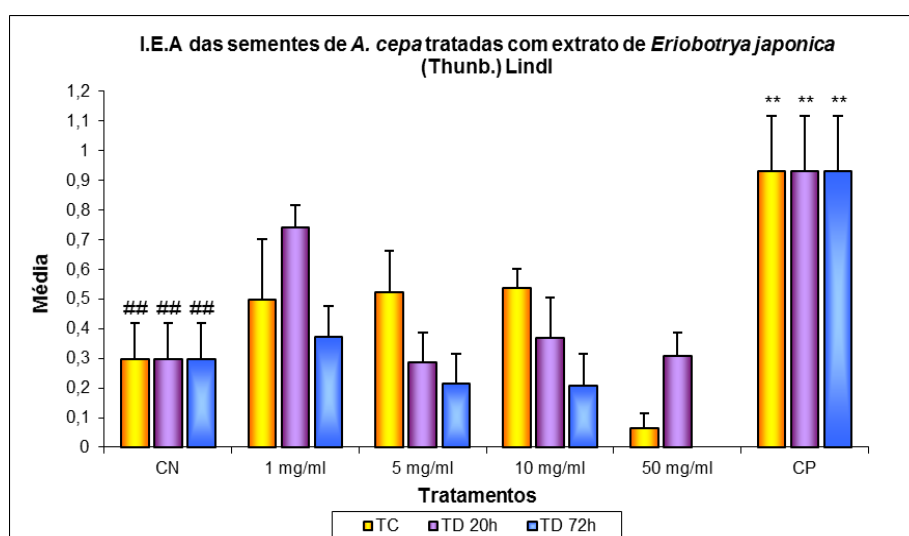
Tratamento	Concentração (mg/mL)	CDV	PNT	Q&P	CBN	MN	AMP	C-M	AD	AT	MO	Total células aberrantes	I.A (%)
CN	-	2987	1	2	2	0	3	6	2	3	0	19	0,313 <sup>##</sup> ± 0,134
CP	1,9 µL/mL	1784	3	23	5	98	0	22	10	1	2	164	2,719 <sup>**</sup> ± 0,607
TC	1	1421	0	0	1	0	1	7	11	3	42	72	1,193 ± 0,392
	5	1592	0	1	3	1	6	10	6	1	33	66	1,077 ± 0,366
	10	1753	0	0	3	2	4	10	9	2	63	98	1,598* ± 0,357
	50	1723	0	0	0	2	0	3	0	0	5	11	0,181 ± 0,100
TD 20h	1	1337	0	0	1	0	8	1	16	3	12	57	0,937 ± 0,073
	5	1164	0	0	1	0	4	3	5	0	35	53	0,836 ± 0,327
	10	1503	0	0	0	0	6	3	10	2	25	48	0,767 ± 0,211
	50	1851	0	0	0	0	4	6	6	2	4	23	0,371 ± 0,110
TD 72h	1	1626	0	0	1	3	3	2	9	7	4	30	0,487 ± 0,148
	5	1554	0	0	0	4	2	2	5	4	4	21	0,364 ± 0,187
	10	1501	1	0	2	0	1	1	6	3	54	69	1,072 ± 0,454
	50												
NÃO RESPONDEU À COLORAÇÃO													

Houve um aumento na ocorrência de todas as classes de aberrações, em especial células portadoras de C-metáfases e aderências, além de morte celular. A aderência é uma anomalia indicadora de danos no material genético que podem se tornar irreversíveis por meio da formação de pontes e quebras cromossômica, conduzindo a célula à morte (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

Observa-se que a quantidade de células mortas aumentou consideravelmente nos tratamentos contínuo e descontínuo agudo, assim como na concentração de 10 mg/mL do tratamento descontínuo crônico, superando o quantitativo observado para o tratamento com a trifluralina. A morte e – consequentemente – alteração na permeabilidade celular pode ser uma explicação para as células não terem respondido à coloração quando submetidas ao tratamento descontínuo crônico com 50 mg/mL.

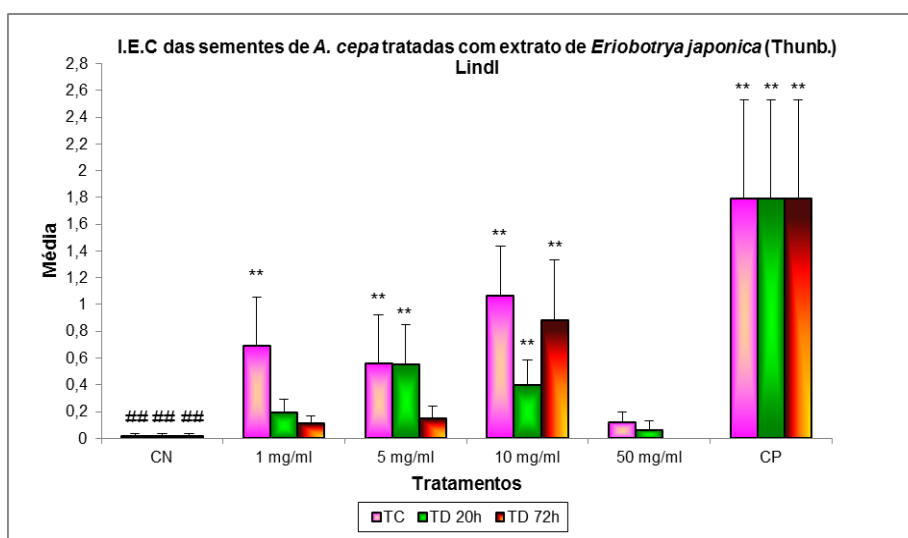
Embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento nos tratamentos contínuo e descontínuo agudo quanto ao índice de aneugenicidade das sementes tratadas com o extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., os valores não apresentaram significância em comparação ao tratamento testemunha (figura 12).

**Figura 12** – Índice de Efeito Aneugênico (I.E.A) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. (1, 5, 10 e 50 mg/mL). \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ , ## - significativo para CP a  $p < 0,01$ .



Quanto ao índice de efeito clastogênico, houve mudança significativa nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/ml do tratamento contínuo, em 5 e 10 mg/mL do tratamento descontínuo agudo e em 10mg/mL do tratamento descontínuo crônico (figura 13), reflexo do elevado número de células mortas encontrado nesses tratamentos.

**Figura 13** – Índice de Efeito Clastogênico (I.E.C) das sementes de *Allium cepa* em resposta aos tratamentos contínuo (TC), descontínuo agudo (TD 20h) e descontínuo crônico (TD 72h) com o controle negativo (CN), controle positivo (CP) e quatro concentrações do extrato etanólico foliar de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. (1, 5, 10 e 50 mg/mL). \*\* - significativo para CN a  $p < 0,01$ ; ## - significativo para CP a  $p < 0,01$ .



Cabe ressaltar que a não significância da concentração de 50 mg/mL dos tratamentos contínuo e descontínuo agudo não sinalizam para um possível efeito protetor ou reversor de genotoxicidade do extrato nesta concentração, mas pode ser atribuída à alteração nos mecanismos de permeabilidade celular, ação típica das saponinas, presentes no extrato dessa espécie. Assim, considerando que as moléculas dos metabólitos secundários presentes na concentração de 50 mg/mL do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. encontram-se em uma quantidade cinco vezes maior do que a apresentada na concentração anterior, pode ter ocorrido uma rápida saturação nos receptores de membrana, reduzindo - portanto - consideravelmente a entrada desses compostos nas células, a ponto de não serem suficientes para provocarem alterações no DNA, mas capazes de propiciar o efeito citotóxico observado (redução no índice mitótico). A presença de alcaloides e sua interação com as saponinas podem ter intensificado os problemas na comunicação intercelular, culminando nos efeitos supracitados.

Efeitos clastogênicos significativos foram igualmente registrados no estudo com dois fitoquímicos vegetais isolados (curcumina e aloína), contudo – ao contrário do presente estudo – houve uma relação concentração-dependente (PALANIKUMAR; RAGUNATHAN; PANNEERSELVAM, 2011).

Os resultados encontrados demonstram, por conseguinte, o caráter citotóxico e mutagênico do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl., sendo que o mecanismo de dano ao material genético é por meio de alterações cromossômicas e morte celular; semelhante à *A. heterophyllum* Lam, os flavonoides presentes no extrato podem ter contribuído para este efeito.

Comparando os dados alelopáticos descritos no Capítulo I com o desenvolvimento do ciclo celular, a queda significativa na capacidade de emissão radicular das sementes de *Allium cepa* mantidas em tratamento com as duas maiores concentrações do extrato de *E. japonica* (Thunb.) Lindl. (10 e 50 mg/mL) pode ser associada com a diminuição ocorrida no índice mitótico; embora as concentrações de 1 e 5 mg/mL também tenham apresentado redução na divisão celular, essa queda não chegou a influenciar o processo de germinação. Conquanto, a partir da concentração de 5 mg/mL já houve reflexo negativo no comprimento radicular e no índice de velocidade de crescimento radicular.

O bioensaio *A. cepa* é utilizado em estudos de mutagenicidade e para predizer os riscos de danos ao DNA em eucariotos (FELICIDADE et al., 2014), sendo – destarte - perfeito para o estudo dos efeitos de substâncias químicas, dentre elas os metabólitos secundários, sobre o organismo vivo, uma vez que o contato direto das raízes com a substância testada permite avaliar diferentes concentrações e identificar alterações celulares nas fases iniciais do desenvolvimento (OLIVEIRA; ROMÃO, 2015); ele auxilia no entendimento da citotoxicidade por meio do retardo/inibição do crescimento radicular e do índice mitótico, da genotoxicidade devido ao surgimento de aberrações cromossômicas, e da mutagenicidade graças à formação de micronúcleos (PATHIRATNE; HEMACHANDRA; SILVA, 2015; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

No caso dos extratos avaliados no presente estudo, não houve um número significativo de células micronucleadas, embora tenham sido verificadas células com



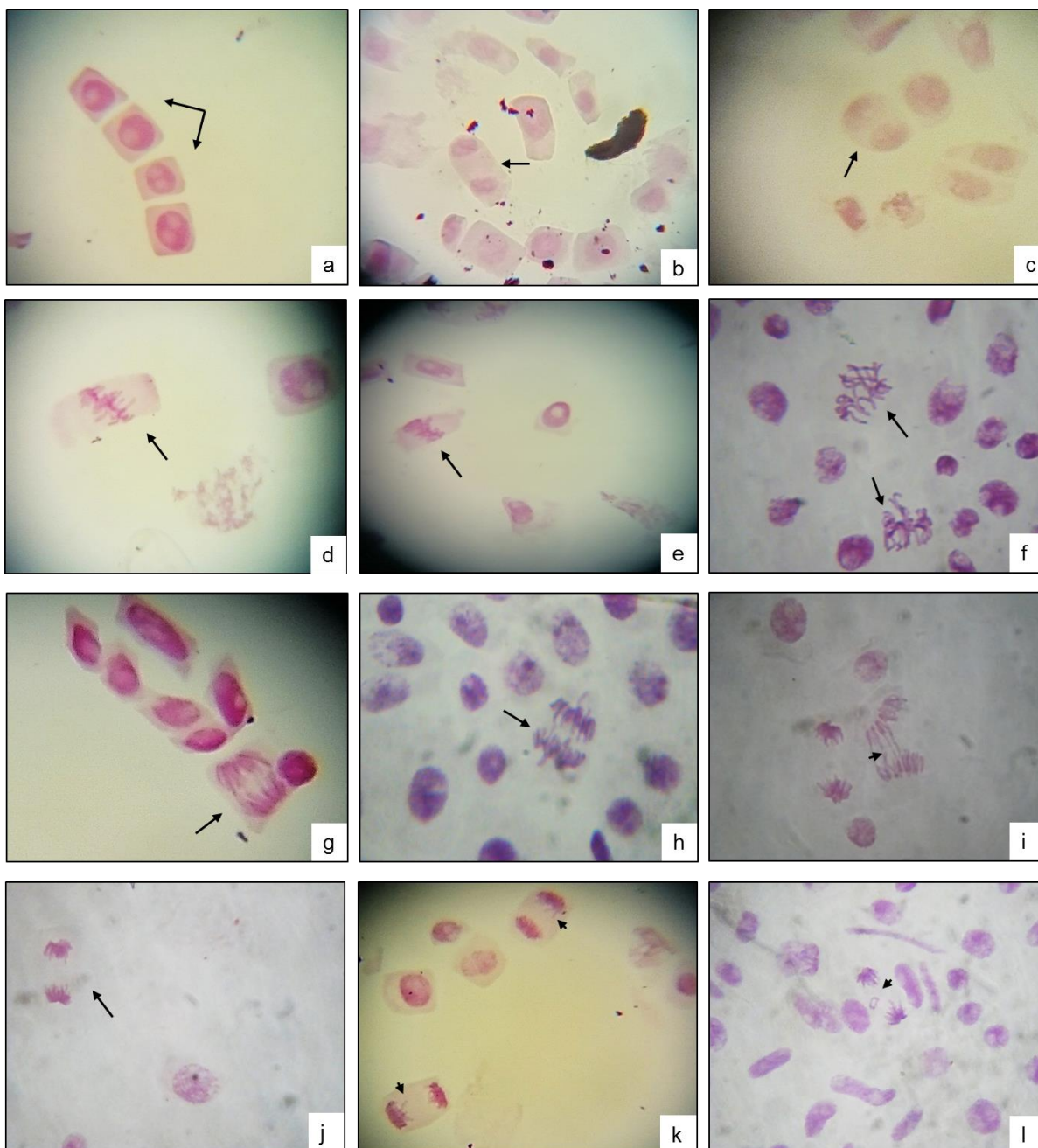
essa característica nos tratamentos contínuos de todos os três extratos e no tratamento descontínuo crônico do extrato de *A. mangium* Willd e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. A inibição ocorrida no início do ciclo celular pode ter contribuído para o baixo número de micronúcleos observados, uma vez que seu surgimento é produto final de um processo mitótico disfuncional, no qual ocorreram quebras cromossômicas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Os extratos de *A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl. apresentaram um aumento no número de células mortas, o que pode ser associado a presença de flavonoides em sua constituição química (vide Capítulo I), uma vez que este é conhecido por interferir no processo mitótico e induzir a célula à apoptose, dependendo de sua classe e concentração (OLIVEIRA; ROMÃO, 2015; TEDESCO et al., 2015; SIMÕES et al., 2017). A interferência no processo mitótico devido a inibição da proliferação celular também é característica dos taninos (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Além disso, das três espécies testadas, apenas aquelas com flavonoides em sua constituição (*A. heterophyllus* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl.) tiveram comportamento mutagênico, confirmando a capacidade deste metabólito de induzir danos ao DNA.

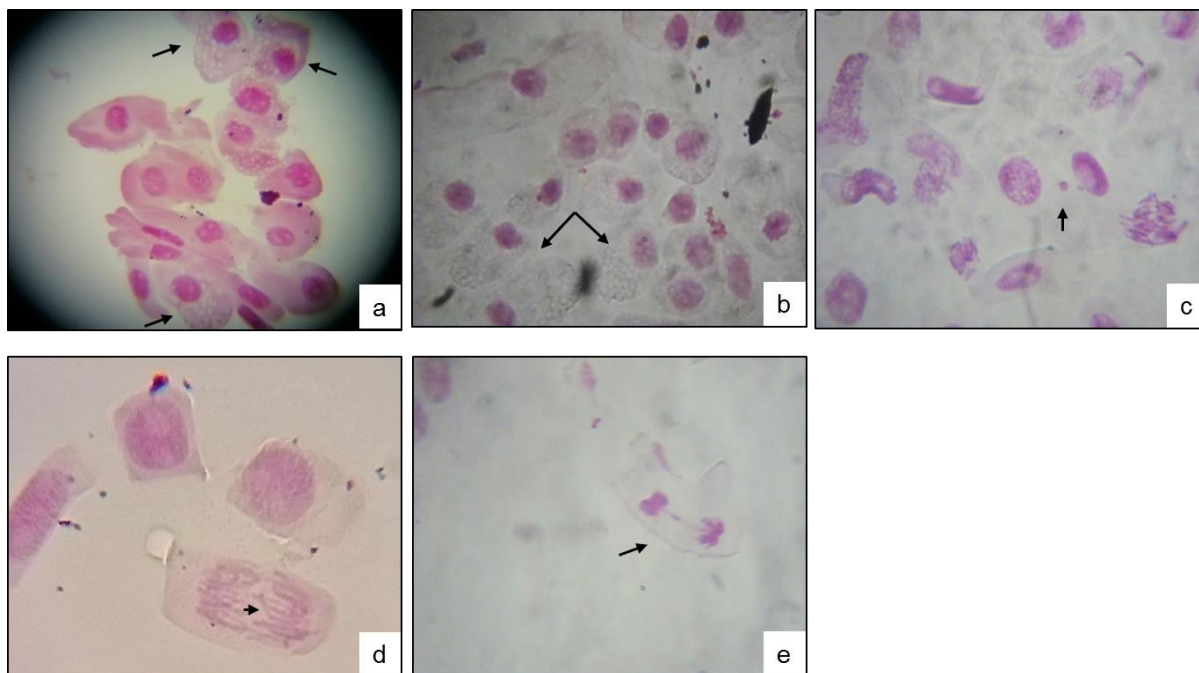
As anomalias aneugênicas observadas nas células tratadas com os extratos vegetais testados encontram-se na figura 14, enquanto as alterações de ordem clastogênica apresentam-se na figura 15.

**Figura 14** – Alterações aneugênicas encontradas nas células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratadas com os extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl., onde: **(a)** – células interfásicas normais; **(b-c)** – célula binucleada; **(d)** – metáfase normal; **(e)** – aderência; **(f)** – c-metáfase (parte superior) e aderência (parte inferior); **(g)** – anáfase normal; **(h)** – anáfase multipolar; **(i)** – anáfase com atraso (ponta da seta); **(j)** – telófase normal; **(k)** – telófases com atraso (pontas de seta); **(l)** – perda cromossômica. Aumento: 400X.



Fonte: Acervo do autor.

**Figura 15** – Alterações clastogênicas encontradas nas células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratadas com os extratos foliares de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb.) Lindl., onde: **(a-b)** – morte celular; **(c)** – célula portadora de micronúcleo; **(d)** – anáfase com quebra cromossômica (ponta da seta); **(e)** – ponte cromossômica. Aumento: 400X.



Fonte: Acervo do autor.

Pontes cromossômicas foram a classe de anormalidades menos encontradas nos tratamentos conduzidos; estas podem ter origem a partir de quebras em cromossomos que perderam a porção telomérica (SOUZA, T.S et al., 2013) e sua baixa ocorrência pode ser explicada pelo bloqueio ocorrido na fase inicial da mitose graças ao tratamento com os extratos de *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb) Lindl., impedindo que as células se encaminhassem para o final do processo, além do número expressivo de células mortas registrado.

Dentre as espécies vegetais testadas, *E. japonica* (Thunb) Lindl. induziu a maior classe (oito) de anormalidades cromossômicas, tendo sido, uma espécie altamente mutagênica, apresentando clastogenicidade em quase todos os tratamentos. *A. mangium* Willd, por sua vez, induziu somente à citotoxicidade, não apresentando resultados significativos para genotoxicidade.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação mutagênica das espécies exóticas invasoras *A. mangium* Willd, *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb) Lindl. demonstrou total correlação com os efeitos alelopáticos verificados no Capítulo I, permitindo inferir, assim, um dos mecanismos alelopáticos empregados por elas. Os efeitos visíveis sobre a germinação e o desenvolvimento dos organismos tratados com *A. mangium* Willd devem-se à citotoxicidade celular, mas não têm nenhuma relação com ações genotóxicas e mutagênicas e podem estar associados a presença de taninos; já os extratos de *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb) Lindl. apresentaram ações tanto citotóxicas quanto mutagênicas, indicando que a alelopatia exercida por estas espécies é reflexo da indução de alterações no ciclo celular e danos ao material genético da espécie-alvo devido aos flavonoides.

Por terem afetado o desenvolvimento inicial de *L. leucocephala* e *U. brizantha* por meio de danos ao material genético destas espécies, os extratos de *A. heterophyllum* Lam e *E. japonica* (Thunb) Lindl. apresentam – dentre os testados – potencial para o desenvolvimento de um produto que atue no controle e erradicação de outras espécies também invasoras, uma vez que, mesmo que a germinação ocorra, a sobrevivência da planta-alvo será profundamente afetada devido ao bloqueio na mitose e pela produção de células danificadas.

Por fim, os resultados obtidos corroboram a importância em se investigar os aspectos citológicos e moleculares da alelopatia, a fim de que se determine se as interferências visualizadas resultam apenas de efeitos tóxicos ou se refletem danos à célula e ao material genético, visto que nem sempre a alelopatia significa mutagenicidade, podendo somente alterar a capacidade germinativa da espécie-alvo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.R. et al. Efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de *Allium cepa*. **Biosci. J**, v. 31, n. 3, p. 934-940, 2015.
- AHMED, F.A.W. Cytotoxic and genotoxic potency screening of WIDE-SPEC pesticide on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 4, n. 24, 2014.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALMEIDA NETO, J. X. de et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) in vivo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.5, n.2, 2005.
- ARRAES, A.I.O.M; LONGHIN, S.R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14; p. 1958-1972, 2012.
- BAGATINI, M.D; SILVA, A.C.F; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- CARITÁ, R; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.
- CARVALHO, J. E. de. **Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde**. 2004. Disponível em: <[www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf](http://www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2014.
- CHAROENYING, P; TEERARAK, M; LAOSINWATTANA, C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 411-416, 2010. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)>. Acesso em: 02 mar. 2016.
- FACHINETTO, J.M; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.
- FELICIDADE, I. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genet. Mol. Res.**, v. 13, n. 4, p. 9986-9996, 2014.
- FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FIRBAS, P; AMON, T. *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with constructed wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **J Bioremed Biodeg**, v. 4, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000189>>. Acesso em: 08 mai. 2016.

FISKEJO, G. The *Allium cepa* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas (Lund)**, v.102, p. 99-112, 1985.

FONSECA, C.A; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Informa**, n. 16, p. 7-8, 2004.

FREIRE-MAIA, N. A evolução dos seres vivos. **Síntese: Revista de Filosofia**, v. 17, n. 51, p. 49-63, 2012.

FRIEDBERG, E.C. A history of the DNA repair and mutagenesis field: The discovery of base excision repair. **DNA Repair**, v. 37, p. A35-A39, 2016.

GIORGI, G. et al. An evaluation of genotoxicity in human neuronal-type cells subjected to oxidative stress under an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Mutat. Res.**, v. 775–776, p. 31-37, 2014.

GOLLAPUDI, P; HASEGAWA, L.S; EASTMOND, D.A. A comparative study of the aneugenic and polyploidy-inducing effects of fisetin and two model Aurora kinase inhibitors. **Mutat. Res.**, v. 767, p. 37-43, 2014.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

KLAUCK, C.R; RODRIGUES, M.A.S; SILVA, L.B. toxicological evaluation of landfill leachate using plant (*Allium cepa*) and fish (*Leporinus obtusidens*) bioassays. **Waste Management & Research**, v. 31, n. 11, p. 1148-1153, 2013.

KUCHY, A.H; WANI, A.A; KAMILI, A.N. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. **Environ Sci Pollut Res**, v. 23, p. 6895–6906, 2016.

LEME, D.M; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat. Res.**, v. 682, p. 71–81, 2009.

LUIZETTI, F. et al. Efeito genotóxico nos eritrócitos de camundongos tratados com creolina via oral. **SaudPesq**, v. 5, n. 3, p. 433-440, 2012.

LUZHNA, L; KATHIRIA, P; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 2013.

MACGREGOR, J.T; CASCIANO, D; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MARTINS, L.A.P.; BRITO, A.P.O.P.M. A história da ciência e o ensino da genética e evolução no nível médio: um estudo de caso. **Estudos de história e filosofia das ciências: subsídios para aplicação no ensino**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2006.

MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MAZZEO, D.E.C; FERNANDES, T.C.C; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p. 13-18, 2011.

MOHAMMED, A.A.S. Cytotoxicity and genotoxicity potential of Thiocyclam in root-tip cells of *Allium cepa*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 601-608, 2010.

OLIVEIRA, A.A; ROMÃO, N.F. Growth inhibition and pro-apoptotic action of *Eleusine indica* (L) Gaertn extracts in *Allium* test. **European Journal of Medicinal Plants**, v.8, n. 3, p. 121-127, 2015.

PALANIKUMAR, L; RAGUNATHAN, I; PANNEERSELVAM, N. Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Turk J Biol**, v. 35, p. 145-152, 2011.

PATHIRATNE, A; HEMACHANDRA, C.K; SILVA, N. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. **Environ Monit Assess**, v. 187, 2015.

PATNAIK, A.R; ACHARY, V.M.M; PANDA, B.B. Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. **Plant Growth Regul**, v. 71, p. 157-170, 2013.

PERALTA-ZARAGOZA, O. et al. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. **Salud pública de México**, v. 39, n. 5, p. 451-462, 1997.

PING, K.Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, p. 7782-7791, 2012.

POHREN, R.S; COSTA, T.C; VARGAS, V.M.F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, 2013.

RADIĆ, S. et al. The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 84-89, 2014.

RIBEIRO, L.R., et al. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.



SILVA, C.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. **Mutat. Res.**, v. 767, p. 8–12, 2014.

SILVA, A.E.P; MOURA, J.W.M; NETO, M.P.L. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da *Turnera ulmifolia* L. (chanana) em células eucarióticas. **Rev. Saúde em foco**, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2015. Disponível em: <<http://189.43.21.151/revista/index.php/saudeemfoco/article/viewFile/694/842>>. Acesso em: 22 abr. 2016.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SISINNO, C.L.S; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SOUZA, P.M.S et al. PLA and organoclays nanocomposites: Degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as test organism. **J Polym Environ**, v. 21, p. 1052-1063, 2013.

SOUZA, T.S et al. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environ Monit Assess**, v. 185, p. 1627-1636, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013.

TEDESCO, S.B. et al. Chromatographic analysis, antiproliferative effect and genotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck on the *Allium cepa* L. test system. **Biosci. J.**, v. 31, n. 4, p. 1213-1221, 2015.

TEDESCO, S.B; LAUGHINGHOUSE, H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: SRIVASTAVA, J. (Ed.). **Environmental Contamination**. InTech, 2012. p. 137-156. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicitythe-allium-cepa-test>>. Acesso em. 19 set: 2015.

TEERARAK, M; LAOSINWATTANA, C; CHAROENYING, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5677-5684, 2010.

VIEIRA, F.S; DANTAS, M.A.T. O protista foraminífero, bioindicador ambiental: uma abordagem para o ensino de ciências e biologia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 8, n. 2, p. 267-282, 2015.

WASSOM, J.S. et al. Reflections on the origins and evolution of genetic toxicology and the environmental Mutagen Society. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 51, p. 746-760, 2010.